E 84

NEDERLANDSCHE PLANTENZIEKTENKUNDIGE
(PHYTOPATHOLOGISCHE) VEREENIGING

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

ONDER REDACTIE VAN

Ir N. VAN POETEREN
Prof. Dr W. K. J. ROEPKE
Prof. Dr JOHA WESTERDIJK
Redactie-adres: Ir N. van Poeteren, Wageningen

Eu. 86

VOL. 49 — 1943
1e AFLEVERING

P 337

INHOUD

Blz.

Prof. Dr E. van Slogteren — De betekenis van de Serologie voor het Virusonderzoek 1

Dr G. F. E. M. Dierick — De ovicide werking van 3,5-Dinitro-O-Cresol 22

Uit de Buitenlandsche literatuur 33

Rectificatie 36

Geheele of gedeeltelijke overname van artikelen uit dit Tijdschrift wordt gaarne toegestaan, mits onder vermelding der bron.

LIDMAATSCHAP NED. PL.ZIEKTENK. VER.

Nederland en Overz. Gewesten en België f 4.—
Buitenland (behalve België) . . . . . f 4.50
Leden ontvangen tijdschrift gratis
ABONNEMENT Tijdschrift . . . . . f 5.—

Penningm. Dr A. J. P. Oort, Ericalaan 5, Wageningen
Betalingen op Postrek. 346310, ten name van: Penningmeester der Nederlandsche Plantenziektenkundige Vereeniging, Wageningen.
De leden in België kunnen hun contributie (13,27 Belgas) voldoen door overschrijving op postrek. No. 115754 van den Heer G. Roland, Ingénieur agronome, Chaussée de Charleroi 23 te Gembloux.

ADVERTENTIËN

Prijzen per plaatsing:

1/8 pag. . . f 2.25 1/2 pag. . . f 5.90
1/4 pag. . . f 3.65 1/1 pag. . . f 9.—

Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 pct korting.

Voor plaatsing wende men zich tot
H. Veenman & Zonen, Wageningen, Tel. 2900.

Printed in Holland

INHOUD

Blz.

Prof. Dr E. van Slogteren — De betekenis van de Serologie voor het Virusonderzoek 1
Dr G. F. E. M. Dierick — De ovicide werking van 3,5-Dinitro-O-Cresol 22
B. J. Hermans — Uit de Buitenlandsche literatuur 33
Prof. Dr H. M. Quanjer — Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond 37
Ir Y. van Koot — Enkele onderzoekingen betreffende de fusariumziekte bij de komkommer 52
Ir Hester G. Kronenberg — Autoreferaat van de voordracht voor de Ned. Plantenziektenkundige Vereeniging op 28 November 1942 te Amsterdam: Virusziekten in aardbeien 74
Helena L. G. de Bruyn — Methode voor het vaststellen van de vatbaarheidsgraad van aardappelknollen voor de aardappelziekte . . 77
Helena L. G. de Bruyn — Aardappelschurft en vruchtopvolging . 100
W. J. Stofmeel — Behandeling van gladiolenkralen met ontsmettingsmiddelen. 109
Ir P. G. Meyers — Waarnemingen omtrent het optreden van erwtenbladrollers 111
Ir J. Temme — Natrot bij tabak (Nicotiana Tabacum) 113
D. Noordam Jr — Over het voorkomen van „Spotted Wilt" in Nederland 117
Ir J. D. Gerritsen — Levenswijze en bestrijding van het kersenmotje 119
H. H. Prell — Aantasting van Knautia arvensis Coulter door Peronospora violacea Berkeley 124
Dr Ir J. J. Fransen — De gevoeligheid van zijderupsen voor Derris- en Pyrethrumstuifmengsels 126
Dr D. J. Kuenen — Spint op de vruchtboomen 130
Drs W. J. Maan — De Preiinsecten 132
B. J. Hermans — Uit de buitenlandsche literatuur 134
Ir C. Mastenbroek — De vatbaarheid van boonenrassen voor de vetvlekkenziekte 135
H. van Vloten — Verschillen in virulentie bij Nectria cinnabarina (Tode) Fr. 163
Dr J. Grosjean — Het vraagstuk van de loodglansziekte bij vruchtboomen 172

NEDERLANDSCHE PLANTENZIEKTENKUNDIGE (PHYTOPATHOLOGISCHE) VEREENIGING

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

ONDER REDACTIE VAN
IR N. VAN POETEREN, PROF. DR W. K. J. ROEPKE
EN PROF. DR JOHA WESTERDIJK

49e Jaargang **1e aflevering** **Jan.-Febr. 1943**

DE BETEKENIS VAN DE SEROLOGIE VOOR HET VIRUSONDERZOEK

DOOR

PROF. DR. E. VAN SLOGTEREN

VOORWOORD

De toepassing van voor de onderzoeker nieuwe methoden van onderzoek, welke hij moet ontlenen aan andere takken van wetenschap zal vooral in de aanvang bijzondere moeilijkheden meebrengen. Dit is stellig ook het geval met de toepassing van de serologie bij het phytopathologisch onderzoek.

Hoewel het reeds 15 jaar is geleden, dat DVORAK het eerst de serologie toepaste bij de bestudering van virus-ziekten van aardappelen en sedert in de phytopathologische literatuur een lange reeks van belangrijke publicaties over de onderzoekingen op dit gebied is verschenen, wordt toch in vele kringen de betekenis van de serologie voor het virus-onderzoek bij onze planten nog niet voldoende gewaardeerd. Hier kan slechts gelden: *niet voldoende* bekend, maakt onbemind!

M.i. moet dit vooral worden toegeschreven aan de volgende feiten:

1e. de handboeken over de serologie behandelen voornamelijk de toepassing op medisch- en veterinair gebied. Op dit gebied werken reeds vele jaren een groot aantal specialisten en daar hier reeds een ruime ervaring bestaat is de stof te uitgebreid en te moeilijk te verwerken voor een phytopatholoog, die zich wil oriënteren omtrent de mogelijkheden, welke de serologie hem voor de oplossing van zijn problemen kan geven.

2e. De phytopathologisch-serologische literatuur, waarin zeer belangrijke resultaten door bekwame onderzoekers bereikt, veronderstelt bij hare lezers een grotere kennis van de grondslagen der serologie, dan in de meeste gevallen aanwezig is.

De terminologie is te moeilijk en zo blijft de toepassing der serologische onderzoekingsmethoden beperkt tot een kleine kring van specialisten op dit gebied.

Het hiervolgende artikel bevat de tekst van een voordracht door mij gehouden voor de phytopathologische sectie der Nederlandsche Botanische Vereniging. Daar de stof te uitgebreid is om in de tijd beschikbaar voor één voordracht voldoende duidelijk te maken, heb ik gaarne de gelegenheid aanvaard om deze in druk te doen verschijnen.

Ik hoop hiermee uiteindelijk de toepassing van de serologie als een hoogst belangrijke en in het tegenwoordige stadium van onze kennis der virus-ziekten on-

misbare hulpwetenschap voor het phytopathologisch virus-onderzoek te bevorderen.

Het ligt voor de hand, dat zij, die tot deze toepassing willen overgaan, er niet aan kunnen ontkomen zich in de bijzondere moeilijkheden van deze tak van wetenschap te verdiepen. Zonder moeite kan geen enkele techniek worden geleerd.

Het volgende kan en wil dan ook niet meer zijn dan een poging om de oriëntering op dit gebied te vergemakkelijken voor de phytopatholoog voor wie dit gebied terra incognita is.

De serologie is stellig geen panacee voor de oplossing van *alle* moeilijkheden van het virus-onderzoek. In vele gevallen zal ze ook niet kunnen helpen, of zal aan andere methoden voorkeur moeten worden gegeven.

Alleen, na eerst kennis te hebben genomen van de serologische methoden van onderzoek, zal de onderzoeker zich echter kunnen afvragen of wellicht langs serologische weg een betere of snellere oplossing kan worden verwacht van zijn eigen problemen, dan langs de tot nu toe gevolgde wegen mogelijk was.

INLEIDING

Bij elk phytopathologisch ziektegeval stelt de onderzoeker zich in de eerste plaats de vraag, waardoor wordt deze ziekte veroorzaakt. Nog meer dan het ziekte-beeld is de zekerheid hieromtrent de basis voor een juiste diagnose, waarmee elk onderzoek wordt aangevangen.

Hebben we met een parasitaire ziekte te doen, b.v. veroorzaakt door een bacterie of een zwam, dan moeten we voldoen aan de drie zgn. postulaten van Koch.

1. De parasiet moet in het zieke individu worden aangetoond.
2. We moeten deze parasiet in reincultuur isoleren en vermenigvuldigen.
3. Met deze reincultuur moeten we bij een volkomen gezond individu de typische ziekteverschijnselen kunnen opwekken en uit het ziekgemaakte organisme de parasiet wederom in reincultuur isoleren.

Daarnaast komt het probleem de ziekteverwekker te identificeren en te classificeren.

Voor de onderzoeker, die tegenover een virusziekte staat, is het onmogelijk aan deze eisen te voldoen, daar het ziekteverwekkende agens niet in de plant is zichtbaar te maken en evenmin in een reincultuur buiten de levende plant is te vermenigvuldigen. De meeste essentiële moeilijkheden, welke het virus-probleem verder nog voor ons oplevert, hangen mede samen met deze onmogelijkheid om het virus direct waar te nemen of om het buiten de plant in vitro te vermenigvuldigen.

Deze moeilijkheden hebben geleid tot het te hulp roepen van vele methoden van onderzoek, welke voor een groot deel berusten op het bepalen van de physiologische en chemische eigenschappen van het virus, en dit onderzoek zodanig hebben gebracht onder de invloed van physici en chemici, dat wij biologen slechts angstig nog een enkel woordje durven meespreken.

Voor velen is het virus reeds „slechts" een „dode stof" geworden en dit is zeer sterk beïnvloed door de ontdekking van STANLEY, die het eerst het virus in een kristallijne gedaante afscheidde. STANLEY zelf toonde zich enigszins ontzet door deze reactie en heeft onlangs verklaart, dat hijzelf niet gaarne de uitspraak voor zijn rekening wilde nemen, dat het virus „slechts" een „dode stof" zou zijn. We

zijn hier volgens hem tè na aan de grens tussen de levende en dode materie, om, bij onze gebrekkige kennis van de aard van het leven, hier een uitspraak te kunnen doen. Ook in dit gedeelte van 's levens nevels, zoals KLUYVER dit uitdrukt, is het licht nog niet voldoende opgegaan.

Bestaat er thans in ruime kringen een zeer grote belangstelling voor het probleem betreffende het wezen van het virus in het algemeen, *het probleem van het virus*, dat ons phytopathologen ten zeerste *moet* interesseren, hiernaast staan wij als plantendokters tegelijk tegenover de *virus-problemen* van onze land- en tuinbouwgewassen, welker oplossing van de allergrootste economische betekenis is. Deze oplossing kan en behoeft gelukkig ook niet te wachten, totdat het algemene probleem een voor allen bevredigende oplossing heeft gevonden.

Door ons onderzoek als biologen zullen wij wellicht ook nog iets mogen blijven bijdragen voor de oplossing van het algemene probleem, dat we, hoezeer we ons ook mogen verheugen in de voor ons zo waardevolle en onmisbare steun der physica en biochemie, toch, zowel op wetenschappelijke als op psychologische gronden, niet gaarne geheel aan de physici en biochemici willen overlaten. Het virus-probleem blijft toch in de eerste plaats een probleem van de levende plant of van het levende dier en het schijnt mij allerminst gewenst, dat, ook bij de bestudeering van het algemene virus-probleem, dit levend wezen te veel uit het oog wordt verloren door een tè eenzijdige bestudering van het virus in reageerbuis, ultra-centrifuge enz.

Intussen blijven wij bij ons onderzoek voornamelijk ernstig gehandicapt door de moeilijkheden om het virus *in* de plant aan te tonen en de viren te identificeren en te classificeren. Dit heeft geleid tot het te veel op de voorgrond plaatsen van uiterlijke ziekteverschijnselen, daar verschillende viren bij dezelfde planten gelijke of bijna gelijke symptomen te voorschijn kunnen roepen en deze verschijnselen bij de zgn. carriers zelfs geheel kunnen ontbreken.

Voor de identificatie van de viren zoeken wij dus de hulp van verschillende methoden van onderzoek.

De pogingen om door het electronen-microscoop het onzichtbare virus aan te tonen, schijnen in enkele gevallen tot het „zichtbaar maken" van virus-lichaampjes te hebben geleid. Van „zien" is hier feitelijk geen sprake meer en voor de normale onderzoeker kunnen we deze methode voorlopig nog wel uitsluiten.

We bepalen dan b.v. het weerstandsvermogen van het virus tegen hoge temperaturen, uitdroging, bewaring in vitro, verdunning, tegen Röntgenstralen; kunnen met de kataphorese-toestellen de electrische lading bepalen, bepalen de grootte van het virus door verschillende filters, bepalen het moleculair-gewicht door middel van ultracentrifuge's en trachten door methoden, verwant aan die der eiwitchemie, het virus in meer of mindere zuiverheid uit het zieke plantensap af te zonderen. Op deze wijze is het gelukt in vele gevallen verschillende viren met meer of mindere zekerheid te identificeeren en in groepen in te delen.

Ook hier speelt de immunologie reeds een rol voor de identificatie en groepering der viren, doordat, zoals uit de onderzoekingen van THUNG, PRICE, OORTWIJN BOTJES e.a. is gebleken, verwante viren, of verwante strains van hetzelfde virus, een beschermende werking voor de aantasting door een ander naverwant lid van de familie kunnen uitoefenen.

Bij al deze proefnemingen geldt het infectie-experiment en het ziektebeeld als maatstaf voor de uitwerking op het virus. Ook een bepaalde vector, of de wijze,

waarop de ziekte mechanisch kan worden overgebracht, kunnen mede dienen voor de identificatie van het virus, maar bij het uitblijven van symptomen bij een bepaalde gastheer, mag stellig niet tot een afwezigheid van het virus in het als infectie-bron gebruikte plantensap worden besloten, terwijl ook bij een lange incubatie-tijd het onderzoek zeer wordt bemoeilijkt. Persoonlijk hebben we dit zeer sterk ondervonden bij het werk met de gewassen, welke wij het genoegen hebben als onze patiënten te mogen beschouwen, nl. onze bloembolgewassen, waarbij men bijna steeds ongeveer een jaar moet wachten om het resultaat van een infectie-proef te kunnen vaststellen.

Voor tal van moeilijkheden van het virus-onderzoek is het nu gelukt een oplossing te vinden door het toepassen van de methoden der serologie, welke thans in vele opzichten een zeer vooraanstaande plaats bij het virus-onderzoek heeft ingenomen. Deze methoden hebben we te danken aan de medische en veterinaire wetenschappen en ze spelen daar een hoogst belangrijke rol bij de immunologie, die reeds zo onschatbare diensten aan de mensheid heeft bewezen. Voor de phytopatholoog bevat dit terrein vele moeilijkheden, die echter niet groter zijn dan die op het gebied der andere hulp-wetenschappen, waarvan we ons tot nu toe hebben bediend.

De serologie is ook nog een betrekkelijk jonge wetenschap en zij, die een beter inzicht in hare problemen willen krijgen, dan ik hier in een korte bespreking kan geven, beveel ik ten zeerste aan het m.i. uitstekende handboek van TOPLEY en WILSON, „The principles of bacteriology and immunity", te bestuderen. Wanneer we echter in dit handboek van ruim 1600 pag. lezen, dat het woord „immunity" eigenlijk is een etiket voor een begrip, waarvan we feitelijk niet meer weten, dan dat het bestaat, en tevens zien hoe ontzaglijk veel toch op dit gebied is bereikt, dan durven wij ook de hier gevolgde methoden toepassen voor ons onderzoek, zonder eerst de eis te stellen, dat wij een volledige verklaring moeten kunnen geven van het mechanisme der serologische reacties. De zijketen-theorie van EHRLICH, de theorie van BORDET en die van ARRHENIUS, die gezamenlijk trachten het inzicht in de processen te verdiepen, maar waarover de specialisten nog strijden, kunnen we thans hier laten rusten.

Wel is het noodig U een kort overzicht te geven van de geschiedenis en de techniek van de serologische reacties, vóórdat we de toepassing hiervan op ons virus-onderzoek bespreken. Ook de gebruikte terminologie moet ik eerst in het kort toelichten.

DE SEROLOGISCHE METHODEN VAN ONDERZOEK.

De grote diensten door de serologie aan de mensheid bewezen, heeft voor de niet-specialisten op dit gebied het begrip serologie zeer eng gebonden aan het begrip therapie. Niet slechts in de kringen van de practische beoefenaars der tuinbouw ontmoeten we vaak de mening, dat wij door de serologie een directe therapie voor de virus-ziekten van onze gewassen willen zoeken.

Tot nu toe is echter het uitzicht op een directe therapie door toepassing der serologie op ons gebied niet groot en voor ons ligt het belang in de diagnostiek. Maar ook voor de medische wetenschap ligt de betekenis der serologie voor een belangrijk deel op het terrein der diagnostiek en we moeten, om enigszins een denkbeeld van de mogelijkheden op dit gebied te krijgen, enkele onderdelen van de historische ontwikkeling der serologie de revue laten passeren.

In 1888 toonde NUTTAL aan, dat gedefibrineerd bloed van zekere dieren de eigenschap bezat, bepaalde bacteriën te doden. In 1889 vond BUCHNER, dat deze eigenschap berustte bij het celvrij-bloedserum en verloren ging als dit 1 uur werd verhit bij 55 °C. In 1890 ontdekten VON BEHRING en KILISATO, dat het bloedserum van dieren, die herhaaldelijk werden ingespoten met sub-letale doses van tetanus-toxinen of diphterie-toxinen de eigenschap bezat deze toxinen te neutraliseren. In 1895 gaf BORDET hieraan de naam antiserum of immunserum en vond, dat dit antiserum, hetwelk bacteriën kon vernietigen (bacteriolyse), bestaat uit 2 bestanddelen:

1. Het complement, een niet specifiek en thermolabiel gedeelte, dat door het inspuiten der dieren (immunisatie) niet toeneemt.
2. een specifiek deel, dat meer thermostabiel is en dat onder de invloed van de inspuitingen toeneemt.

Hiertegenover heet het bloed-serum van een dier, dat niet is ingespoten en de specifieke antistoffen niet bevat: *normaal serum.*

Uit deze ontdekkingen heeft zich het begrip immuniteit en de immunologie ontwikkeld.

Men onderscheidt een *natuurlijke* immuniteit, die aangeboren is en een *verworven* immuniteit, welke een dier bezit tegen een bepaalde infectie, nadat het een ziekte, door deze infectie veroorzaakt, eenmaal heeft doorgemaakt.

Zoals reeds eerder door mij medegedeeld, is het mechanisme, waarop deze verschijnselen berusten, feitelijk onbekend, maar men weet, dat het doormaken van een ziekte gepaard gaat met het ontstaan, respectievelijk vermeerderen in het bloed van de patiënt van stoffen, die of indirect de verwekker van de infectie of zijn producten in hun pathologische werking remmen.

Deze stoffen heten anti-stoffen of immuun-stoffen en zijn meestal specifiek. Men noemt deze stoffen agglutininen, precipitinen, amboceptoren, bacteriolysinen, opsoninen, antitoxinen enz.

De stoffen, die deze „antibodies" doen ontstaan, noemen we een „antigeen" en dit kan zijn elke stof, die, onveranderd in dierlijke weefsels gebracht, daarin de vorming van antibodies stimuleert, en, indien gemengd met deze antistoffen, hiermee op de een of andere waarneembare wijze reageert.

Een antigeen heeft dus twee eigenschappen:

1. het stimuleert de vorming van antibodies,
2. het moet hiermee specifiek reageren.

Er zijn ook onvolledige antigenen, zgn. haptenen, die wél specifiek met de antibodies reageren, maar de vorming hiervan niet stimuleren.

Antigenen zijn meestal stoffen, bestaande uit grote moleculen of moleculaire aggregaten en bestaan gewoonlijk, maar niet noodzakelijk, geheel of gedeeltelijk uit eiwitten. Aan hun oppervlak bezitten ze zgn. determinerende groepen, welke de specificiteit van de reacties bepalen.

Een antibody is elke stof, die in het bloed of het lichaamsvocht van een dier verschijnt in antwoord op de stimulus van de invoer van een antigeen in de weefsels.

Hoe antibodies ontstaan is geheel onbekend. Die, welke zijn onderzocht, gelijken op serumglobulinen, maar zijn zodanig gewijzigd, dat ze zich specifiek verenigen met de een of andere determinerende groep van de antigenen.

Vereniging van antibodies en antigenen wordt gevolgd door een aantal reacties, die in vitro kunnen worden waargenomen en op deze reacties berust de betekenis van de serologie, ook voor het virusonderzoek.

Voordat ik deze reacties bespreek zullen we ons nog vertrouwd moeten maken met de voornaamste terminologie van de serologie.

Wat is het verschil tussen een serum en een vaccin?

We weten reeds, dat het mogelijk is het weerstandsvermogen van een patiënt te verhogen, hem zelfs geheel te immuniseren door het verhogen van de specifieke antistoffen tegen de infectie (het antigeen) in zijn bloed.

We spreken hierbij van een *passieve immunisatie*, wanneer de patiënt wordt ingespoten met het bloedserum van een mens of dier, dat de ziekte heeft doorgemaakt en rijk is aan antistoffen; dit is het zgn. *antiserum.*

Actieve immunisatie noemen we, indien de patiënt a.h.w. zelf het werk doet, doordat de vorming van antistoffen in zijn bloed wordt bevorderd, door hem te vaccineren. Dit is mogelijk door hem in te spuiten:

a. met een verzwakte stam van het antigeen.

b. door gebruik te maken van het product van een levende bacterie (toxine), dat op de een of andere wijze geheel of gedeeltelijk is ongiftig gemaakt.

b.v. het diphterie-toxine kan met formaline ongiftig worden gemaakt. We noemen dit dan een anatoxine, dat, hoewel niet meer giftig, toch zijn antigene, antibodyvorming stimulerende werking heeft behouden.

c. door het inspuiten van gedode bacteria, die ook hun antigene werking hebben behouden en hun pathologische werking hebben verloren.

Zoals reeds is gezegd, moeten we voor het virus-onderzoek voorlopig tevreden zijn met het gebruik van de serologie voor de *diagnostiek*, evenals in de medische wetenschap, afgezien van elke therapie, ook veel gebruik wordt gemaakt van de specificiteit van de antistoffen, die door een bepaald antigeen worden opgewekt, voor het herkennen van speciale ziekten.

Ik heb zoeven enkele van deze antistoffen genoemd en voor ons zijn hiervan het belangrijkst de agglutininen, lysinen en precipitinen. De serologen hebben zich reeds lang de vraag gesteld of deze alle verschillende soorten van antibodies zijn, of eenzelfde soort, die verschillende dingen doet. Het laatste wordt thans meer aangenomen, maar bij de hieronder nader beschreven reacties hebben we hier meer direct met de verschillende uitingen te doen.

De zijketen-theorie van EHRLICH dwingt tot de zgn. pluraliteit der anti-lichamen. Voor elk antigeen (ook van de kunstmatig bereide!) zou in het lichaamsvocht reeds het antibody aanwezig moeten zijn.

We moeten vooral in het oog houden, dat bij alle serologische reacties, welke we uitvoeren, het telkens weer gaat om de onderlinge reactie tussen het antigeen (dus het stimulerende agens, dat de specifieke antibodies in het serum heeft doen ontstaan) en de specifieke antibodies. We spreken bij deze reacties van een *homoloog* antiserum, indien we dit laten reageren met het specifieke antigeen, dat de stimuleerende werking op het serum heeft uitgeoefend en van een *heteroloog* antiserum, indien het wordt onderzocht t.o.v. een ander antigeen.

In de eerste plaats maken we dan gebruik van de *precipitatie-reactie*, welke ontstaat tussen het antigeen i.c. precipitinogeen en de stof in het serum: precipitine. Aan de ontdekking van deze reactie is voorafgegaan de zgn. *agglutinatie-reactie*, welke hiermee nauw samenhangt en ontstaat door de binding van het *agglutinogeen en agglutinine.*

Vermoedelijk zijn de precipitinen en de agglutininen identiek en treden de eerste op, indien de stoffen zich in oplossing bevinden, en de laatste, wanneer ze zich als een emulsie voordoen.

De agglutinatie-reactie is het eerst beschreven door GRUBER en DURHAM in 1896. Zij hadden een konijn ingespoten met typhusbacillen en voegden bij een suspensie van typhusbacillen in 0,85 % NaCl wat serum van het ingespoten konijn. De bacillen kleefden nu, na toevoeging van het serum, zodra ze tegen elkaar aankwamen, aan elkaar en er ontstonden vlokken en korrels. Bloedserum van dit met typhusbacillen ingespoten konijn deed b.v. pneumococcen en cholera-vibrionen *niet* samenklonteren.

Omgekeerd deed het serum van een konijn, ingespoten met choleravibrionen, wèl cholera-vibrionen samenklonteren, maar typhusbacillen niet. Het verschijnsel bleek dus specifiek te zijn voor bacteriën en voor het onder hun invloed gevormde anti-serum.

Dit samenklonteren noemen we agglutineren en de reactie: de agglutinatie-reactie. De stof in het serum, die voor de agglutinatie verantwoordelijk is, is het agglutinine en de stof in de bacterie of de bacterie zelf (het antigeen), die de agglutinine in het serum kan doen ontstaan: agglutinogeen. We hebben dus in de agglutinatie-reactie een prachtmiddel voor het herkennen van bacteriën. WIDAL gebruikte deze reactie het eerst als diagnose-middel voor patiënten, die verdacht werden te lijden aan typhus en deze reactie heet dan ook de *reactie van Widal.*

Nu komt het echter voor, dat het serum van een typhus of van een paratyphus-patiënt zowèl typhus als paratyphus-bacillen agglutineert.

We kunnen hier te maken hebben met drie verschillende mogelijkheden:

1. de patiënt heeft een dubbele of meng-infectie, heeft dus zowel typhus als paratyphus-bacillen.
2. de patiënt heeft typhus, maar daar de typhus-bacil nauw verwant is aan de paratyphus-bacil hebben ze één of meer antigenen (hier dus agglutinogenen) gemeen en dus wordt de typhus-bacil ook door het paratyphusserum geagglutineerd.
3. de patiënt heeft paratyphus, maar door dezelfde oorzaak als onder 2 genoemd, wordt de paratyphus-bacil ook door het typhusserum geagglutineerd.

We spreken in de gevallen 2 en 3 van mee-agglutinatie of co-agglutinatie.

Met de reactie van WIDAL kunnen we dus niet uitmaken met welke van de drie gevallen we te doen hebben en hiervoor moeten we gebruik maken van de *verzadigingsreactie van Castellani.*

Dat ik hier zover inga op deze schijnbaar alleen voor de medische kant belangrijke diagnose, is, omdat we bij het onderscheiden van de verschillende strains van hetzelfde virus, die ook één of meer antigenen gemeen hebben, principieel dezelfde weg moeten volgen, al wordt tot mijn verbazing in de botanische literatuur over de virus-serologische diagnostisering de naam van CASTELLANI niet genoemd.

Bij de verzadigingsreactie van CASTELLANI gaat men uit van het serum van de patiënt, waarvan een deel wordt verzadigd met typhusbacillen en een ander deel met paratyphusbacillen. De antigenen uit deze bacillenstammen binden uit het patiëntenserum de corresponderende homologe agglutininen.

Typhus en paratyphusbacillen hebben één of meer antigenen gemeen en deze gemeenschappelijke antigenen worden in beide gevallen gebonden.

VERZADIGINGS-REACTIES VAN CASTELLANI

Noemen we de antigenen van typhus a + b en die van paratyphus b + c, dan doen deze ontstaan de antibodies A + B en B + C

We nemen drie mogelijkheden nl. de patient heeft:	Typhus		Paratyphus		Meng-infectie typhus+paratyphus	
Zijn serum heeft dan de antibodies	A+B		B+C		A+B+C	
	I	II	I	II	I	II
Men neemt telkens twee buisjes patiënten serum . .	A+B	A+B	B+C	B+C	A+B+C	A+B+C
Verzadigd telkens I met typhus- en II met paratyphusbacillen	a+b	b+c	a+b	b+c	a+b	b+c
Mengsel bevat dus	A+B+ a+b	A+B+ b+c	B+C+ a+b	B+C+ b+c	A+B+ C+a+b	A+B+ C+b+c
De homologe antibodies worden neergeslagen en er resteren de heterogene antibodies:	O	A	C	O	C	A
Hierna eerst reageren met typhus-bacillen (a+b) . .	0+a+b	A+a+b	C+a+b	0+a+b	C+a+b	A+a+b
resultaat reactie	−	+	−	−	−	+
Daarna reageren met paratyphus bac. (b+c)	a+b+c	A+b+c	C+b+c	0+b+c	C+b+c	A+b+c
resultaat reactie	−	−	+	−	+	−

Nemen we b.v. aan voor typhus de antigenen a + b, waarmee in het serum corresponderen de antibodies A + B en

voor paratyphus de antigenen b + c, waarmee in het serum corresponderen de antibodies B + C.

In beide buisjes wordt door het antigeen, het antibody B gebonden en daarna worden beide buisjes afgecentrifugeerd en bewaard.

Stel nu dat de patiënt typhus heeft, (antibodies A + B), dan hebben de antigenen der typhusstam (a + b) de beide antibodies A + B gebonden en het verzadigde serum zal nu in tweede instantie niet meer reageren met typhus of paratyphusbacillen.

Het patiënten-serum, dat verzadigd is geworden met paratyphusbacillen (antigenen b + c) bezit nà de eerste reactie geen paratyphus-antibody meer (B is gebonden), maar nog wel een deel van de typhus-antibodies A en zo zal in tweede instantie het buisje met patiënten-serum nog wèl met typhusbacillen, maar niet meer met paratyphusbacillen reageren.

Men zegt nu: het typhusagglutinine is hoofdagglutinine en het paratyphusagglutinine is bij-agglutinine (zie tabel).

Indien de patient paratyphus had, dan zijn de uitkomsten der agglutinine-reacties juist andersom (zie tabel).

Indien er echter een dubbele of meng-infectie is, waarbij de patiënt dus zowel door typhus als door paratyphusbacillen is geïnfecteerd, dan zullen er na de

verzadiging met typhusbacillen nog agglutininen voor paratyphusbacillen overblijven en omgekeerd zullen er na verzadiging met paratyphus nog agglutininen voor typhusbacillen overblijven, die dan beide met de reactie van WIDAL kunnen worden aangetoond (zie tabel).

Zeer na verwant met de hiervoor beschreven agglutinatie-reactie, is de *precipitatie-reactie*, in 1897 ontdekt door KRAUS. Hij voegde bij serum van een konijn, ingespoten met choleravibrionen, een filtraat van een bouillon-cultuur van cholera-vibrionen en zag hierbij een troebeling ontstaan, die gevolgd werd door een precipitaat.

Ook deze reactie bleek specifiek te zijn voor bacterie en serum. De factor in het serum voor de reactie verantwoordelijk noemen we precipitine en die in het filtraat precipitinogeen; de reactie: precipitatie-reactie. Het precipitinogeen is weer het antigeen of maakt daarvan een deel uit.

Nu kunnen echter niet alleen bacteriën in het serum van proefdieren precipitinen opwekken, doch elke andere als antigeen werkende stof kan dit doen en dit heeft geleid tot een zeer veelzijdige toepassing van de precipitatie-reactie op zeer verschillend gebied.

Ik heb reeds een definitie van een antigeen gegeven, en het typerende en het belangrijkste voor de serologische reactie is nu, dat ze in hoge mate specifiek zijn.

Zelfs optische isomeren van dezelfde stof kunnen als verschillende antigenen werken, elk hun eigen specifieke antibodies vormen en met behulp van hun homoloog serum worden aangetoond.

Hebben we tegen een bepaald antigeen eenmaal een antiserum gemaakt, dan kunnen we van elk onbekend antigeen, door het al of niet specifiek reageren met het bekende antiserum uitmaken of het al of niet identiek is met het bekende.

Reeds in 1902 gebruikte BERTACELLI deze reactie om verontreinigingen van meel met *Vicia faba* vast te stellen en de reactie geeft de mogelijkheid om de vervalsing van levensmiddelen en veevoer door vreemde stoffen aan te tonen; (worst, vlees, vleespasteien, melk, melkproducten, eieren en eiproducten).

Meel verontreinigd door *Agrostemma Githago*, moederkoren in roggemeel, alles in hoeveelheden, welke chemisch niet meer waren aan te tonen, zijn door de precipitatie-reactie ontdekt. Het meest bekend is misschien nog wel de mogelijkheid van de herkenning van de oorsprong van bloedvlekken, stellig bekend aan de lezers van verslagen van rechtszittingen en detective-romans.

Ook voor de bepaling van verwantschap tussen verschillende diergroepen: paard – ezel, schaap – geit, mens – mensaap zijn serologische reacties gebruikt en onder leiding van MEZ is, door de Königsbergerschool, een stamboom van het plantenrijk opgesteld in verband met serologische verwantschap tussen de systematisch bij elkaar behorende planten.

Ook het eiwitmetabolisme van planten werd bestudeerd door serologische reacties, waarbij kon worden aangetoond, dat planten eiwitstoffen door de wortels hadden opgenomen.

En zo heeft ook de serologie een rol kunnen spelen voor het virus-onderzoek, waarbij het virus, of liever meestal het sap van viruszieke planten, wordt gebruikt als antigeen om bij de ingespoten dieren een antiserum tegen deze ingespoten stoffen te verkrijgen.

Voor het virus-onderzoek is wel het meest gebruik gemaakt van de precipitatiereactie, die relatief het gemakkelijkst is uit te voeren, maar er zijn nog enkele

andere serologische reacties, die in enkele gevallen de voorkeur verdienen, omdat ze nòg meer specifiek zijn of nòg gevoeliger zijn en in de serologische literatuur over het virus-onderzoek telkens weer worden genoemd.

Ik ben daarom verplicht deze reacties nog even in het kort te bespreken. De eerste is de zgn. anaphylactische reactie en de tweede de zgn. complement-bindingsreactie.

Wat is de anaphylaxis? Ook hierover bestaat een zeer uitgebreide literatuur en meer dan één theorie, die tezamen nog veel onverklaard laten.

Serologisch komt de anaphylactische reactie hierop neer, dat een dier (vooral cavia's worden voor deze proefnemingen veel gebruikt, omdat dit dier bijzonder gevoelig is voor deze reactie) ingespoten met een kleine hoeveelheid eiwit (het antigeen, hier dus anaphylactogeen) na ongeveer 3 weken een zeer grote gevoeligheid krijgt tegen dit bijzondere eiwit, waarmee het is „gesensibiliseerd".

Een tweede enting met ditzelfde eiwit veroorzaakt na de genoemde periode van ongeveer 3 weken hevige contracties van de spieren, welke dikwijls in enkele minuten de dood veroorzaken kan.

Deze reactie is hoogst specifiek en hoogst gevoelig. Het nadeel, dat een cavia slechts éénmaal kan worden gebruikt voor een dergelijke reactie, wordt vermeden door de techniek van SCHULTZ-DALE, die gebruik maakt van de contracties van de uterushorens van een cavia, welke in een bepaalde vloeistof in een waterbad worden gebracht en na zgn. desensibilisatie opnieuw kunnen worden gebruikt. 1 cc van 1 : 1/10.000.000 oplossing van paardenserum in 150 cc vloeistof geeft een zeer scherpe reactie.

De reactie SCHULTZ-DALE is zeer gevoelig voor zgn. gezonde planten-eiwitten, maar ongevoelig voor virus-eiwitten. Hieruit heeft men ook willen concluderen, dat de molecuul-grootte van de virus-eiwitten groter is dan die der gezonde normale eiwitten, waardoor bij de techniek van SCHULTZ-DALE de moleculen minder goed door diffusie in de spierweefsels van de uterushorens kunnen binnendringen. Bij de anaphylactische shock, waarbij het antigeen direct in de weefsels van het levende dier wordt ingespoten, treedt de reactie door virus-eiwitten wel zeer scherp op.

De gevoeligheid van de anaphylactische reactie wordt ook nog duidelijk doordat het CHESTER is gelukt door deze reactie in de zgn. viruseiwitkristallen van STANLEY nog resten van de normale eiwitten der gezonde planten aan te tonen.

Complement-bindingsreactie:

Een andere zeer belangrijke serologische reactie is de zgn. complementsbindingsreactie, welke eveneens zeer gevoelig is.

Hiermee kreeg CHESTER met de virus-eiwitkristallen van STANLEY een reactie bij een verdunning van 1 : 10.000.000 en met zgn. ruw-planten-virus-sap bij 1 : 2.500.000.

De complementbindingsreactie is veel gevoeliger dan de precipitatie-reactie, welke met de kristallen van STANLEY een positieve reactie gaf bij een verdunning van 1 : 200.000, tegenover de complementbindingsreactie, zoals zo juist gezegd bij 1 : 10.000.000, dus een verhouding van 1 : 50.

De complementbindingsreactie is echter in uitvoering zo veel meer gecompliceerd, dat voor niet ervaren serologen de techniek niet aanmoedigend is. Indien men echter eenmaal voldoende routine bezit, zullen de voordelen van hogere gevoeligheid en zeer sterke specificiteit haar meer op de voorgrond brengen. De bekende Wassermannreactie is b.v. ook een complementbindingsreactie.

Het is een indicator-reactie, welke psychologisch dit nadeel heeft, dat een positieve reactie betekent, dat het virus, of in het algemeen het gezochte antigeen, *niet* aanwezig is en omgekeerd.

Het complement is het a-specifieke thermolabiele bestanddeel van het antiserum.

Bij een positieve reactie tussen *antigeen* en *antibody* wordt *complement gebonden.*

Mengen we dus een onbekend antigeen en antibody bij aanwezigheid van een bekende hoeveelheid complement, dan kunnen we, uit het al of niet binden van dit complement, vaststellen of er een positieve reactie tussen antigeen en antibody heeft plaats gehad, m.a.w. of antigeen en antibody *homoloog* zijn.

Hoe kunnen we nu dit verbruik of deze binding van complement vaststellen?

Indien we een konijn inspuiten met rode bloedlichaampjes van een schaap, dan krijgen we in het antiserum als antistoffen: *haemolysinen.* Deze haemolysinen hebben de eigenschap rode bloedlichaampjes te ontleden, maar kunnen dit alléén, indien er vrij complement aanwezig is.

Is er bij een mengsel van antischapenbloedserum en rode schapenbloedlichaampjes vrij complement aanwezig, dan treedt dus lysis in (vloeistof wordt rood) — is er geen vrij complement aanwezig, dan blijft de lysis uit (de vloeistof verandert niet van kleur).

We kunnen dus een mengsel van antischapenbloedserum en rode schapenbloedlichaampjes als indicator voor het al of niet aanwezig zijn van vrij complement gebruiken. Dit mengsel noemen we het *haemolytisch systeem.*

De reactie geschiedt als volgt:

A: Antigeen + Antibody + (vers cavia serum) + complement { binding: homoloog / geen binding: heteroloog

B_1: geïnactiveerd antischaapserum + bloedlichaampjes → geen lysis.

(B_2: „ „ + „ + vers cavia complement → lysis.)

C: A + B_1 { lysis (*positief*): *heteroloog,* dus b.v. niet virus-ziek of gezocht virus niet aanwezig (negatief) / geen lysis: (*negatief*): *homoloog,* dus b.v. wèl virus-ziek of gezocht virus wèl aanwezig (positief)

TOEPASSING VAN DE SEROLOGISCHE METHODEN VOOR HET PHYTOPATHOLOGISCH VIRUS-ONDERZOEK

Na deze lange, maar voor een juist begrip van het volgende, noodzakelijke inleiding komt dan de vraag:

Wat kunnen we nu hiermee bereiken voor het phytopathologisch virus-onderzoek?

Zoals ik reeds heb gezegd: voorlopig geen therapie van de individuele plant, maar wel een zeer grote steun voor een snelle en objectieve diagnose, die de basis moet zijn voor de oplossing van het virus-probleem van onze planten.

Hoe belangrijk dit ook is, hiermee alleen is de grote betekenis van het serologische virus-onderzoek echter verre van voldoende belicht.

Ik zeide reeds in het begin, dat de serologie een oplossing geeft voor vele voor het virus-onderzoek karakteristieke moeilijkheden en waar deze ook langs andere wegen kan worden gevonden, heeft de serologische methode voor zéér veel gevallen nog het voordeel, dat ze veel *sneller* tot een resultaat leidt en tevens, dat haar uitspraak *meer objectief* is.

Behalve de identificatie van het betreffende virus, vinden we hiermee tegelijk de *natuurlijke verwantschap* en hierdoor een zeer waardevolle steun voor de classificatie der viren.

Deze classificatie berustte tot nu toe vrijwel geheel op een kunstmatig systeem sterk afhankelijk van het subjectieve oordeel der samensteller.

We kunnen verder serologisch het virus quantitatief bepalen in verschillende planten en in verschillende weefsels van dezelfde planten of in planten-extracten, de invloed van allerlei chemische en physische invloeden op het virus controleren en ons inzicht in het algemene-virus-probleem belangrijk verdiepen.

Ik zal hieronder een kort resumé geven van de belangrijkste literatuur op dit gebied; uit de aard der zaak moet dit zeer beknopt en onvolledig zijn, daar b.v. CHESTER een lijst geeft van meer dan 400 titels van verhandelingen, welke met dit onderwerp in verband staan.

Voornamelijk zal ik trachten de hoofdlijnen aan te geven en voor de details verwijs ik naar de speciale literatuur.

Na de vele toepassingen, welke ik zo juist beschreef, van de serologische reacties ook op plantensystematisch en plantenphysiologisch gebied, is het niet vreemd, dat ook de phytopathologie hierin werd betrokken en in 1927 opende DVORAK de reeks van onderzoekers op dit gebied. Hij stelde vast, dat de globulinen in mosaïc-zieke aardappelen door het virus zodanig werden veranderd, dat hun precipitatie-reactie t.o.v. homoloog mosaïc-antiserum en heteroloog gezond antiserum sterk verschilde.

Het zijn verder vooral HELEN A. PURDY-BEALE (1928–1934), MATSOMOTO en SOMAZAWA (1930–1934), GRATIA (1933), BIRKELAND (1934), BAWDEN en PIRIE (1936), STANLEY en vooral CHESTER (1934–1937) geweest, die belangrijke bijdragen op het gebied van het serologische planten-virus-onderzoek hebben geleverd.

Behalve de identificatie van verschillende viren stelde CHESTER b.v. een lijst op van 8 groepen van viren, samen met in totaal 34 strains, in elke groep variërend van 1 tot 9, die alle serologisch door hem werden onderscheiden.

MATSOMOTO en SOMAZAWA bepaalden de concentratie van het virus in verschillende gedeelten van dezelfde plant en vonden meer in het blad dan in de wortel en meer in de wortel dan in de stengels. Zij werkten een micro-methode uit, waardoor ze het virus konden vaststellen in zeer kleine weefselgedeelten en meenden hierdoor een oordeel te kunnen uitspreken over de wijze van vervoer van het virus door de plant. Een vervroegde diagnose was mogelijk, doordat ze bij infectie-proefnemingen, enige dagen vóór het optreden van enig ziekte-symptoom serologisch de aanwezigheid van het virus konden vaststellen.

CHESTER wijst in het bijzonder op de voordelen van het serologische quantitatieve virus-onderzoek t.o.v. de methoden der local-lesions van HOLMES. Het antiserum toch kan worden bewaard zonder in werkzaamheid achteruit te gaan, waardoor ten allen tijde hiermee kan worden gewerkt en het resultaat niet behoeft te wachten op de geschikte planten voor de infectie-proeven, terwijl de invloeden van milieu op het infectie-resultaat ook geen rol spelen. Het belang van de mogelijkheid van het vaststellen van het virus in geheel symptoomloze carriers is voor elk virus-onderzoeker vanzelf duidelijk.

Tenslotte is het van groot belang, dat naast de hiervoor besproken serologische reacties, welke in de reageerbuis worden waargenomen, de antigeen-antibody reactie ook aan de levende plant kan worden bestudeerd.

Het is nl. gebleken, dat de viren door hun homologe antisera worden geïnactiveerd of geneutraliseerd en ook deze reactie is zowel sterk specifiek als quantitatief.

Voor neutralisatie van een 2 × grotere hoeveelheid virus is ook een 2 × grotere hoeveelheid homoloog antiserum nodig.

Door toevoeging van voldoende antiserum kan zo het infectie-vermogen van een infectieus plantensap geheel worden weggenomen. Deze reactie is eveneens gebruikt voor de bepaling van verwantschap tussen zekere plantenviren en biedt mogelijkheden van verdere toepassing bij de studie van de fundamentele problemen van het planten-virus onderzoek. (CHESTER. Phytopathology 1934).

Het is verder van grote principiele betekenis, dat bij de binding van virus en antibody nòch het virus, nòch het antibody wordt vernietigd, daar uit het geneutraliseerde mengsel het virus weer kan worden vrijgemaakt door vernietiging van de antibodies met pepsin, terwijl door aanzuring van het geneutraliseerde mengsel het virus kan worden vernietigd en de antibodies vrij komen. Zowel virus als antibody, vrijgemaakt uit het geneutraliseerde mengsel, blijken hun karakteristieke eigenschappen nog te hebben behouden.

Nu oefenen ook normaal serum en andere eiwitten, b.v. melk een invloed uit op het infectie-resultaat door het virus veroorzaakt. Volgens CHESTER is dit toe te schrijven aan de invloed van het normale serum en andere eiwitten op de *gastheer* en niet op het virus zelf.

STANLEY en CALDWELL verklaren, dat normaal serum wèl direct op het virus werkt en niet op de gastheer.

BAWDEN is van oordeel, dat zowel de specifieke als de aspecifieke werking van antiserum en normaal serum direct op het virus en niet op de gastheer inwerken. Het is onbekend, wat er geschiedt, maar hij acht het waarschijnlijk, dat het virus niet-infectieuse complexen vormt door zich te verbinden met de serumeiwitten. De binding van het virus met het antibody is sterker dan de binding met de serumeiwitten.

Beide partijen geven een verklaring, toegelicht met grafische voorstellingen, welke in gedaante veel overeenkomen, maar verschillend worden geïnterpreteerd.

Het geheel van tot nu toe vermelde resultaten moet stellig de virus-onderzoeker erg aanlokkelijk toeschijnen. Een dergelijk menu wekt de eetlust op en daarom stellen we hier terstond de vraag voorop, of dat nu allemaal kan worden klaargestoofd volgens het gegeven recept, of dat er nog bijzondere keukengeheimen zijn, die de zaak nog meer ingewikkeld maken, dan het oppervlakkig wellicht reeds schijnt.

Dit laatste is eigenlijk met elke techniek het geval en evenmin als men uit een kookboek alleen zonder veel schade het koken kan leren, is het gemakkelijk de serologie uit een korte handleiding of zelfs uit een uitvoerig handboek te leren, zelfs waar het betreft de practische toepassing daarvan.

De techniek is niet eenvoudig, maar toch ook niet weer veel moeilijker dan enig andere techniek en enige leerjaren, liefst onder een ervaren leermeester, heeft men steeds nodig. Elke waar is echter naar hetgeen men er voor moet betalen en de uitkomsten der serologie rechtvaardigen in vele gevallen ruimschoots de moeite hieraan te besteden. De technische moeilijkheden zijn voor een groot deel „les defauts de ses qualités". De buitengewoon grote gevoeligheid geeft in enkele gevallen last, die slechts door de uitzonderlijke specificiteit wordt opgeheven. De toepassing van elke techniek, ontleend aan een andere tak van wetenschap, moet zich instellen op de omstandigheden en de eisen van de eigen problemen en de bijzondere eigenschappen van het eigen materiaal.

Een zeer belangrijk punt is daarbij voor ons, dat, indien we werken met planten

of plantenextracten en hiermee een antiserum willen bereiden, we niet met een enkelvoudig antigeen werken, maar met een groot complex van antigenen tegelijk, die elk voor zich weer eigen specifieke antibodies opwekken, zodat in het verkregen antiserum het complex van antibodies even samengesteld is als het complex van antigenen, waarmee we zijn begonnen. We kunnen ze a.h.w. als een spiegelbeeld tegenover elkaar stellen.

Indien we nu een konijn inspuiten met gezond plantensap, dan krijgen we in het antiserum antibodies, tegen alle stoffen in het gezonde sap aanwezig, die als antigeen werken, b.v. x-soorten van antibodies.

Bij het inspuiten van sap van een zieke plant in het bloed van een konijn krijgen we nu, behalve het gehele eerste complex van x-antibodies, nog *bovendien* de antibodies tegen die antigenen, welke karakteristiek zijn voor de zieke plant, dus het complex x-antibodies + de virusantibodies. Het verkregen antiserum (x-antibodies + virus-antibodies), zal dus zowel met een gezonde als met een zieke plant een positieve reactie moeten geven.

Onze redding ligt nu in het feit, dat al deze antibodies zeer specifiek zijn, waardoor we ze door de zgn. verzadigingsreactie, volgens het principe van de reeds eerder uitvoerig beschreven reactie van Castellani, kunnen scheiden.

Ons thans beperkende tot de precipitatie-reactie, dan weten we dus dat we door het inspuiten van een konijn met sap van een virus-zieke plant een antiserum verkrijgen met precipitinen tegen gezond plantensap, benevens precipitinen tegen de karakteristieke antigenen van het zieke sap.

We moeten nu beschikken over volkomen gezonde planten, die, behalve wat het virus-gehalte betreft, met de zieke plant geheel overeenkomen. We zullen dan het antiserum eerst samenbrengen met dit gezond sap en krijgen dan een positieve reactie, welke zich uit in een precipitaat. We centrifugeren dit precipitaat af en voegen zolang gezond plantensap toe, totdat er tegen dit gezonde plantensap geen precipitaat meer in het antivirusserum ontstaat.

Het anti-virusserum is dan zgn. verzadigd met gezond plantensap en in dit serum bevinden zich dan alleen nog de antistoffen tegen de virus-fractie van het zieke sap. Indien we daarna een positieve reactie verkrijgen met een verdachte plant, dan mogen we aannemen, dat de plant, waarvan het sap afkomstig is, is aangetast door hetzelfde antigeen (virus) als waarmee het antiserum indertijd is bereid.

Indien we een negatieve reactie verkrijgen, dan moeten we nog rekening houden met de mogelijkheid, dat het zgn. gezond materiaal, voor de verzadiging van het antiserum gebruikt, een „masked strain" van het virus bevatte. In dat geval is het virus mee uitgevlokt en *moet* de volgende reactie tussen viren en antiserum wel negatief zijn.

Is het sap voor de verzadiging gebruikt inderdaad volkomen gezond, dan is de verdachte plant òf gezond, òf aangetast door een ander virus, òf, wat ook nog mogelijk is, de verhouding tussen concentratie van antigeen (virus) en antibody (antiserum) is niet gunstig voor een positieve reactie.

Er bestaat in het algemeen een optimale verhouding tussen concentratie van virus en antibody voor een maximale reactie en dit eist een nader onderzoek betreffende deze verhoudingen, vóórdat men de eindconclusie mag trekken. Het gehalte aan specifieke antistoffen in het antiserum wordt terstond na de bereiding van het antiserum vastgesteld, door te bepalen in welke verdunning het serum nog een positieve reactie geeft met een vaste hoeveelheid van het homologe antigeen. We noemen dit gehalte de titer van het serum en deze titer hangt af van ver-

schillende factoren, zooals: de aard van het antigeen, de concentratie hiervan in het ingespoten sap, het aantal inspuitingen, dat het konijn heeft gehad, de wijze, waarop het proefdier reageert, enz.

Bij de tabaksplant krijgen we een titer van 1 : 9 met gezond sap, tegen 1 : 2000 met ziek sap. Hierdoor is slechts een zeer geringe verzadiging nodig om de anti-gezond-antibodies te verwijderen, maar bij zwak serologisch werkende viren is deze verhouding vaak minder gunstig en is een veelvoudige verdunning van het antiserum met gezond sap voor de verzadiging nodig. Hierdoor kan, mede, omdat we ook reeds de verdunning van het virus in het plantensap hebben, de titer zo laag worden, dat we geen of geen behoorlijke reactie meer kunnen verkrijgen. Het ligt daarom voor de hand, dat we als immuniserend antigeen (dat bij het konijn wordt ingespoten) gaarne met zo sterk mogelijke virusconcentratie en met zo veel mogelijk uitschakeling van alle niet essentieel voor het onderzoek noodzakelijke antigenen werken.

Volgens de methoden, welke de eiwitchemie leert en ook bij de zuivering der viren met zoveel succes zijn toegepast, trachten we daarom zowel uit antiserum als uit antigeen alle overtollige ballast te verwijderen, maar moeten natuurlijk, evenals bij de virus-zuivering, er voor zorgen niet met het badwater tegelijk het kind te verliezen.

Voor een gedeelte kunnen we de moeilijkheden ondervangen door voor onze viren als gastheer planten te zoeken, die systematisch zover mogelijk uiteen liggen, en geen serologisch werkzame antigenen gemeen hebben.

Dounin en Popova hebben een oplossing hierin gezocht, dat ze een antiserum bereiden tegenover het gezonde plantensap. Met dit anti-gezond serum verzadigen ze nu het zieke sap, waardoor ze alle antigenen van het gezonde sap konden neutraliseren en nu spuiten ze het konijn in met het heldere gedeelte van het mengsel: ziek sap + gezond antiserum, nadat het precipitaat is afgecentrifugeerd.

Hebben we alles gedaan om de resultaten der reacties niet door lastige antigenen, buiten het virus-antigeen, te doen vertroebelen, dan blijven nog de moeilijkheden, welke we samenvatten onder spontane uitvlokkingen. Dit zijn dus uitvlokkingen, die in serum of plantensap ontstaan buiten de serologische reacties om, en in enkele gevallen de resultaten onzeker kunnen maken. Deze geven ook aan ons soms nog moeilijkheden, die voor enkele in dit opzicht bijzondere lastige gewassen wellicht voorlopig nog een grens aan de bruikbaarheid der serologische methode van onderzoek zullen stellen.

Om zeker te weten, dat we niet hiermee te doen hebben, is uit de aard der zaak bij elk onderzoek een zeer sterk letten op de controle-proeven met het gezonde sap en het normaal serum noodzakelijk. Overal waar er iets aan deze controles hapert, mogen we geen conclusies trekken uit het experiment.

Zijn we de moeilijkheden van de complexen van antigenen en corresponderende antibodies van het gezonde sap en ook de artefact-reacties der spontane uitvlokkingen ontzeild, dan staan we voor de kwestie, dat ook het virus niet een enkelvoudig antigeen is, maar eveneens een complex van antigenen.

Alle viren, die antigenen gemeen hebben met het homologe antigeen, waarmee het antiserum is gemaakt, geven met dit antiserum een positieve reactie. Hoe meer deze viren verwant zijn, des te meer antigenen hebben ze gemeen en zo is de sterkte der reactie een maat voor de natuurlijke verwantschap der antigenen.

Ook weer volgens het principe van de verzadigingsreactie van Castellani zijn

deze verwante viren te scheiden, indien ze niet serologisch geheel identiek zijn, en zo kon CHESTER zijn 8 groepen van viren opstellen, met in totaal 34 verschillende strains.

Al zijn dus de serologische reacties in eerste instantie groep-reacties, het bezwaar, nog vaak in de literatuur genoemd, dat hiermee niet de verschillende rassen van hetzelfde virus zouden zijn te onderscheiden, gaat in vele gevallen niet op. De resultaten van CHESTER bewijzen dit afdoende. Hij geeft nog uitdrukkelijk aan, dat hij wel eens een negatief resultaat heeft verkregen, maar nog nimmer is gebleken, dat hij bij een positief resultaat een virus of een strain van een virus onjuist had geclassificeerd.

Een groot voordeel van de serologische methode is, dat de volkomen (serologische) identiteit van twee viren kan worden vastgesteld door de door BAWDEN beschreven „mirror-tests". Hiervoor worden tegen beide viren antisera gemaakt en daarna wordt elk virus verzadigd met het heterologe antiserum. Zijn ze volkomen identiek dan mogen ze geen van beiden, na de verzadiging met het heterologe antiserum, een positieve reactie meer geven tegen hun homologe antiserum.

Indien we hier tegenover stellen, dat om dit langs de weg van bepaling der infectie-verschijnselen en symptomen te bereiken, van elk virus de host-range zo volledig mogelijk moet worden vastgesteld, wat telkens weer opnieuw tot nieuwe series infectie-experimenten met alle daaraan verbonden zorgen moet leiden, dan komt ook hierdoor het belang van de serologische methode duidelijk naar voren.

Bij de infectie-methode is het vaak zeer moeilijk om de zwak-infectieuse viren van de sterk infectieuse te scheiden. Ook hier zou de serologie hulp kunnen bieden, daar de sterke infectieusiteit meestal gepaard gaat met een sterke serologische activiteit. Het zou dan mogelijk zijn door de behandeling van het virusmengsel met het antiserum tegen het sterk infectieuse virus in het mengsel het sterke virus te neutraliseren en zo het zwakke virus af te zonderen. We hebben dit geprobeerd met de hypothetische tulpenviren I en II, maar tot nu toe is ons dit niet gelukt, al geven we de strijd nog geenszins op.

Kunnen we nu *alle* moeilijkheden met de serologie oplossen? Dat zou inderdaad te mooi zijn en elke methode heeft zijn eigen grenzen. Het is niet mogelijk gebleken tegen alle viren een antiserum te verkrijgen en hierbij komt weer naar voren een parallel tussen de weinig stabiele en zwak-infectieuse viren en de zwak-serologisch-actieve viren.

De natuur komt ons hierbij in enkele gevallen te hulp, doordat vaak moeilijk mechanisch over te brengen viren, die ook bij alle in vitro reacties te instabiel blijken, door hun speciale vectors voldoende worden geïdentificeerd, terwijl die viren, welke door hun wijde verspreiding en uitgebreide kring van gastheren het moeilijkst te identificeren zijn, wel bruikbare antisera leveren.

CHESTER geeft, als betrekking tussen serologische activiteit en infectieusiteit, het resultaat aan van zijn onderzoekingen betreffende 25 verschillende viren:

Serologisch actief	Serologisch inactief
a. gemakkelijk mechanisch over te brengen.	moeilijk of niet mechanisch over te brengen.
b. betrekkelijk stabiel in vitro.	betrekkelijk onstabiel in vitro; gewoonlijk vernietigd in 2 dagen of korter bij kamertemperatuur.

c.	Thermaal inactivatie-punt relatief hoog, gewoonlijk stabiel bij 55 °C of hoger.	Thermaal inactivatie-punt beneden 55 °C.
d.	Spoedig (Systemic) aantasting van de gehele plant	dikwijls zeer zwak systemic.

Een reden van de moeilijkheden met deze viren kan zijn de zeer zwakke concentratie van het virus in de plant en dan moeten we trachten dit op de hiervoor genoemde wijzen te concentreren. Wellicht heeft de bloedtemperatuur van het konijn een nadelige invloed op het thermolabiele virus en zo wordt de mogelijkheid genoemd om voor de bereiding der antisera een koud-bloedig dier te nemen. We moeten echter bedenken, dat de serologie ook nog een jonge wetenschap is en de beperkingen van het plant-serologisch-virus-onderzoek zijn voor een groot deel nog die van de serologie in het algemeen.

De plantserologen hebben tot nu toe hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de betrekkelijk minst gecompliceerde methode der precipitatie-reacties. Het zal wellicht mogelijk zijn de resultaten nog meer te verbeteren door het toepassen van de meer gecompliceerde techniek der anaphylactische- en van de complementbindingsreactie. De resultaten zijn echter ook nu reeds zeer belangrijk en volgens mijn oordeel onmisbaar voor het virus-onderzoek en ik verwacht voor de toepassing bij verdere verbetering der techniek een grote toekomst.

Maar bovenal de serologie wil, noch mag vragen een monopolie van het virusonderzoek. Ze wil zijn een hulp-wetenschap, in de eerste plaats voor het virusprobleem van onze zieke planten, en daarnaast voor het algemene probleem van het virus.

Maar wij blijven biologen, voor ons zijn de levende planten het voornaamste en nu heeft de serologie ons toch weer in de armen der chemie geworpen.

We lezen bij Topley en Wilson, pag. 184:

„Clearly we must not press analogies too far, or accept uncritically the attractive but perhaps misleading resemblances that present themselves between certain of the concepts evolved by the organic or physical chemist and those to which our immunological studies have led us. But whatever the ultimate findings may be, the line of advance has been clearly laid down.

So far as the antigen-antibody reactions are concerned, immunology has become a branch of chemistry."

en Chester schrijft:

„de serologie is tot nu toe de voornaamste basis voor het onderzoek der specificiteit".

Meer dan de nog bestaande onvolkomenheden en beperkingen van de serologische methoden moet ons daarom tenslotte, juist in verband met de beoordeling van de waarde van de positieve resultaten, de principiele vraag interesseren: wat doen we eigenlijk bij de serologische reacties? Ook al kunnen nòch wij, nòch de ervaren immunologen en serologen het mechanisme van de reacties verklaren, we moeten ons toch wel de vraag stellen:

Is het antigeen = het virus?

Deze vraag hebben bijna alle onderzoekers zich eveneens gesteld en alles bijeengenomen komen ze tot de conclusie, dat er geen reden is om er aan te twijfelen, dat het virus zelf is het zeer sterke antigeen in infectieus plantensap.

CHESTER heeft de vragen gesteld (1935):
Is het antigeen:
1. het virus zelf?
2. een veranderd planten-eiwit?
3. een derivaat van het virus?
4. een complex van eiwit en virus?

Hij voert een aantal feiten aan, welke door het serologisch onderzoek zijn vastgesteld:

1. Tabaks-mosaic-virus gezuiverd zoveel als enigszins mogelijk van alle andere antigenen of andere verontreinigingen blijft gelijk antigenisch.
   Zelfs indien 95% van de niet-virus bestanddelen zijn verwijderd, verandert de antigene-werking niet.
2. Viren door collodium filters van één grootte gefiltreerd, laten tegelijk het pathologisch werkzame en het serologisch actieve deel door.
3. De sterkte van de precipitatie-reactie varieert rechtstreeks met de hoeveelheid infectief materiaal, onverschillig van welke gastheer het virus afkomstig is.
4. Hij heeft voor 4 verschillende viren vastgesteld, dat de temperatuurdoseringen, welke het infectie-vermogen inactiveren ook in dezelfde verhouding de serologische reactie doet verdwijnen.
5. Verandering der P_h geeft dezelfde reacties van pathologische werking en serologische activiteit.
6. Reactie op chemische inactivatie: geheel als onder 4 en 5 genoemd.
7. In zeer ver van elkaar verwante plantensoorten, waarin normaal in het geheel geen gemeenschappelijke antigeen + eiwitten voorkomen, behouden de viren hun normale specifiek serologische reacties. Er bestaat dus geen noodzakelijk verband tussen gastheer en virus-serum-reacties:

a. indien *verschillende* viren in *dezelfde* gastheer worden vermenigvuldigd, geeft toch ieder zijn eigen specifieke serologische reacties.

b. indien *hetzelfde* virus in systematisch zeer ver uiteenliggende gastheren wordt gekweekt, behoudt het onafhankelijk van de gastheer zijn eigen specifieke serologische reactie.

Zijn conclusie is dan ook, dat er bewijsmateriaal genoeg is om aan te nemen, dat het antigeen, verantwoordelijk voor de serologische reactie, tussen het plantvirus en homoloog antiserum, is het virus-zelf en niet normale of veranderde bestanddelen van de zieke planten.

Ook BAWDEN en BAWDEN en PIRIE (1936) spreken zich zeer beslist in dezelfde geest hierover uit: Als het virus geïnactiveerd wordt door proteolytische enzymen: Trypsin, pepsin en papain, dan is de vermindering in activiteit van het infectie-vermogen evenredig aan de verzwakking der serologische activiteit. Ook zij hebben vastgesteld, dat bij inactivatie door hitte of chemische middelen van het virus de serologische activiteit zolang blijft bestaan, zolang het virus actief blijft. De afname in infectievermogen en serologische activiteit neemt in dezelfde verhouding af en als het infectievermogen geheel verloren gaat, dan houdt ook de serologische activiteit op.

Volgens BAWDEN is het feit, dat de sterkst gezuiverde viren het sterkst serologisch actief zijn, ook het sterkste bewijs voor de aanname, dat het antigeen het virus zelf is, en er bestaat dan ook volgens hem geen reden om er aan te twijfelen, dat het virus-zelf is het zeer sterk actieve antigeen aanwezig in infectieus plantensap.

Er is door enkele onderzoekers als bezwaar tegen deze opvatting aangevoerd,

dat het is gelukt door middel van formaline en trypsine het infectie-vermogen geheel of gedeeltelijk te vernietigen, zonder dat de antigeen-werking verloren gaat.

CHESTER voert hiertegen aan, dat de uitwerking van de trypsine berust op een uitwerking op de gastheer waardoor volgende infectie-proeven negatief worden.

Het feit, dat geïnactiveerde viren niet als antigeen werken, terwijl dode bacteria hun antigeen eigenschappen behouden, zou er op kunnen wijzen, dat de viren verschillen van zekere lagere vormen van leven. Het is echter niet bewezen, dat de protoplast van de bacteria de antigene werking uitoefent en recente onderzoekingen suggereren, dat de periphere structuur van de bacteriën serologisch van belang is. Nu is de oppervlakte-structuur van de bacteria meer stabiel, dan de protoplast, waardoor het mogelijk is, dat de bacteria hun serologische eigeschappen na hun dood behouden. Hij concludeert hieruit:

„Findings with the plant-viruses, on such a basis, offer no ground for objection to a biotic conception of these agents."

Voor mij is het als bioloog, ook als we werken met een serologische methodiek, die dan tot het terrein der chemie moet worden gerekend, een terrein, waar ik mij allesbehalve als deskundig zou durven beschouwen, een voordeel, dat we telkens weer teruggrijpen op de reactie van de levende plant en telkens weer aan deze levende plant het resultaat van het onderzoek verifieren.

Al is het wellicht slechts een fictie, toch heb ik het gevoel, dat ik me daarbij meer op vertrouwd en eigen terrein bevind.

We zullen ook bij de serologie daarom een voortdurend contact met de zieke en gezonde planten niet kunnen ontberen en onze conclusie moeten toetsen aan reacties, welke we tussen de levende plant en het virus kunnen waarnemen.

EIGEN ONDERZOEK

Tenslotte een zeer kort woord over ons eigen werk met de serologische methoden voor het virus-onderzoek van onze bloembolgewassen.

In de eerste plaats past me hier een woord van dank aan Dr. J. P. BIJL, die ons door zijn daadwerkelijke hulp bij onze eerste stappen op dit gebied, en daarna door zijn raadgevingen bij optredende moeilijkheden, grote diensten heeft bewezen. Dat we iets hebben bereikt, hangt verder voornamelijk af van de bekwaamheid en toewijding van mijn medewerksters Mej. Dr. DE BRUYN OUBOTER en Mej. CREMER.

Nu moet U niet denken, dat wij nu reeds alle fijne schoteltjes, U juist van het menu der serologie voorgezet, geheel foutloos kunnen bereiden. Ook onze gewassen stellen weer hun bijzondere eisen, maar wel kan ik U mededelen, dat we tot nu toe een antiserum met een behoorlijk hoge titer hebben kunnen bereiden van: Narcissen, Tulpen, Hyacinthen en Irissen. Met de Lelie's hadden we nog geen voldoende succes, wat voor een deel moet worden toegeschreven aan de moeilijkheden om volkomen gezond en betrouwbaar vergelijkings- en verzadigingsmateriaal te verkrijgen en verder door storende „spontane uitvlo kkingen". Met de Narcissen hebben we het langste gewerkt en tot nu toe het meeste bereikt.

Het is moeilijk een positief infectie-resultaat met Narcissen door het mechanisch overbrengen van het virus te verkrijgen. Het is Mej. DE BRUYN OUBOTER enige jaren geleden gelukt dit in betrouwbare percentages te verkrijgen en nu we ook de zekerheid hebben, welke luizen de ziekte kunnen overbrengen, zullen we vermoedelijk nog wel een hoger percentage positieve resultaten verkrijgen.

Maar... tot nu toe moesten we ongeveer een jaar wachten om enig resultaat te kunnen waarnemen.

Thans stellen we een diagnose met zekerheid in enkele uren!

Wat dit zeggen wil voor de bestudering van het ziekteprobleem, behoef ik verder hier niet uiteen te zetten.

Alle moeiten tot nu toe aan het serologisch onderzoek besteed, de leerjaren inbegrepen, zijn hiermee ruimschoots beloond.

Met de zgn. veld-methode, door CHESTER uitvoerig beschreven en door ons ook meermalen toegepast, is het thans mogelijk te velde in twijfelgevallen ter plaatse in korte tijd een diagnose te stellen. Ook voor de land- en tuinbouw opent dit ruime mogelijkheden, welke van grote economische betekenis kunnen zijn, vooral doordat ook de carriers op snelle wijze als dragers van het virus kunnen worden herkend.

In dit verband wil ik nog wijzen op de uitwerking welke CHESTER van zijn zgn. veld-methode heeft gegeven.

Het komt vaak voor, dat voor een speciale cultuur een bepaalde virus-ziekte grote, economische verliezen kan opleveren, indien de besmette planten niet vroegtijdig worden verwijderd.

Een vroeg herkennen van de virus-dragers, een snelle en vooral zekere diagnose bij de zgn. „twijfelplanten" is hiervoor onmisbaar. In dergelijke gevallen is het mogelijk een grotere hoeveelheid antiserum tegen zieke planten van het bepaalde gewas te doen bereiden en dit te voren met sap van gezonde planten te verzadigen.

Zij, die belast zijn met het opsporen der zieke planten kunnen buisjes met dit verzadigde antiserum bij zich dragen en zullen in bepaalde gevallen door het toevoegen van enkele druppels sap van de verdachte planten ter plaatse kunnen uitmaken of de plant aan de betreffende ziekte lijdt.

Natuurlijk is ook hierbij ervaring nodig voor het herkennen van de reacties, maar deze kan elke enigszins intelligente controleur in betrekkelijk korte tijd verkrijgen, zonder dat hij de techniek van de bereiding der antisera en de verdere laboratorium techniek behoeft te beheersen.

Ook onderzoekers die zelf niet in staat zijn, door het ontbreken van de hiervoor noodzakelijke installaties, konijnenstallen en alles wat daarmede samenhangt, zullen van elders bereide antisera een zeer dankbaar gebruik kunnen maken voor de diagnose hunner viren en voor het verloop van hun onderzoek.

In onze cultuur is het in vele gevallen een zeer belangrijke factor geweest, dat we op grond van onze serologische reacties, de kweker, ook in zgn. twijfelgevallen bij het alleen afgaan op de symptomen, met stelligheid konden verzekeren, dat de plant inderdaad ziek was. Dit was een zeer sterke morele steun voor het krachtig ter hand nemen van de ziektebestrijding in het te velde staande gewas.*)

De techniek van de bereiding der antisera is door mij niet besproken. Na de

*) Sedert het uitspreken van deze voordracht in Maart 1942 is het mijn medewerkers, waarbij thans ook Dr H. L. Booy, in enge samenwerking met het Instituut voor suikerbietenteelt te Bergen op Zoom, Directeur: Dr P. J. H. van Ginniken, gelukt een serologisch actief antiserum te bereiden met vergelingsziekte suikerbieten.

Hiermee hebben we reeds in enkele gevallen bij „twijfelplanten" het ziek zijn kunnen vaststellen en we hopen, dat de serologie ook voor de bestudering en bestrijding van deze voor onze voedselvoorziening vooral in deze tijden zo bijzonder belangrijke ziekte haar nut zal bewijzen. Onze onderzoekingen hieromtrent zullen we zo spoedig mogelijk publiceren.

voordracht is een serologische film gedraaid, waarin deze techniek en de precipitatie reactie werden vertoond.

De bereiding van het antiserum moet zich aanpassen aan het gebruikte materiaal en de eisen van het onderzoek. Zeer beknopt volgt hier nog de bereiding van antisera, zoals deze door ons wordt uitgevoerd.

De planten worden fijngesneden en in een Carver-pers onder hoge druk (300 à 700 atm.) uitgeperst. Het sap wordt ± 10 minuten gecentrifugeerd (5000 omwentelingen per minuut) en van het sap wordt 5–8 cc intraveneus in een oor vene van een konijn ingespoten.

Dit wordt met een tussenruimte van 2 à 3 dagen 9 tot 12 maal herhaald, waarna een proefreactie wordt verricht met een weinig vooraf genomen bloed en de titer van het serum bepaald. Is deze proef bevredigend, dan wordt na 8 dagen, waarvan de laatste 24 uur het konijn niet meer gevoed mag worden, het bloed onder narcose uit de carotis afgenomen.

Na enige uren bewaren bij kamertemperatuur gaat het bloed in de ijskast en de volgende dag wordt het serum afgeschonken, waarbij de bloedkoek in de buis achterblijft. Het antiserum wordt bij zo laag mogelijke temperatuur in de ijskast bewaard en staat dan steeds ter beschikking voor de verschillende onderzoekingen. Wij hebben het serum zo reeds meer dan twee jaren kunnen bewaren zonder al te grote achteruitgang van de titer.

DE OVICIDE WERKING VAN 3,5-DINITRO-O-CRESOL

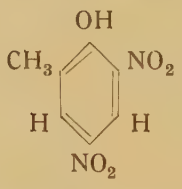
DOOR

DR. G. F. E. M. DIERICK

Publicatie van het Laboratorium der N.V. De Bataafsche Petroleum Maatschappij te Amsterdam, afdeeling Plantenziektenbestrijdingsmiddelen

De laatste jaren wordt dinitro-o-cresol steeds meer gebruikt als ovicide voor bespuitingen in den winter, speciaal ter bestrijding van bladluizen op vruchtboomen.

3,5-dinitro-o-cresol is een lichtgeel gekleurde, kristallijne stof met de volgende structuurformule [1]):



De zouten zijn zeer sterk oranjegeel gekleurd en explosief. Het vrije zuur lost zeer moeilijk in water op; in gedestilleerd water bij kamertemperatuur slechts voor ca 0,024%, in minerale olie daarentegen kan ca 2% opgelost worden. De alkalizouten van het dinitro-o-cresol zijn beter oplosbaar in water dan het zuur.

Reeds verscheidene onderzoekers hebben getracht de ovicide werking van deze stof te bepalen. Zij gebruikten daarbij het dinitro-o-cresol zoowel opgelost in water als in een minerale olie-emulsie. Uit deze literatuurgegevens is echter gebleken, dat de toxische werking van dinitro-o-cresol-houdende preparaten zeer verschillend is, zonder dat daaruit een eenvoudig verband met de concentratie kon worden afgeleid.

GIMINGHAM c.s. (3, 4, 5) onderzochten de ovicide werking van deze stof o.a. op wintervlinder (*Cheimatobia brumata* L.), op witvlakvlinder (*Orgyia antiqua* L.), op bladluizen (*Aphis pomi* DE GEER, *Anuraphis roseus* BAKER), op bladvloo (*Psylla mali* SCHM.) en op de geometride, *Selenia tetralunaria* HUFN. Zij vinden daarbij slechts een klein verschil in werking tusschen een dinitro-o-cresol-oplossing en een oplossing van natrium-dinitro-o-cresolaat; voor *S. tetralunaria* is resp. 0,0147% en 0,0167% noodig om 50% van de eieren te dooden, terwijl ook de concentraties, waarbij 100% der eieren gedood worden, voor beide stoffen niet ver uiteenliggen (4). Dit resultaat is in tegenspraak met hetgeen bij ons eigen onderzoek over de toxische werking van deze stoffen gevonden is.

Ook SHAW en STEER (7) hebben proeven genomen om de toxiciteit van dinitro-o-cresol te bepalen. Om eieren van *Aphis pomi* volledig te dooden, vinden zij, dat een kaliumzoutoplossing van ca 0,25% noodig is.

Wordt dinitro-o-cresol in olie opgelost, dan was, zoo constateerde GIMINGHAM (5), reeds een concentratie van 0,05% voldoende om bladluiseieren te dooden.

[1]) Tegenwoordig begint men dikwijls de nummering bij de OH-groep als 1, zoodat de naam van deze stof dan wordt 4,6-dinitro-o-cresol of wel 2-hydroxy 3,5-dinitro tolueen.

Ook HOUGH (6) heeft gevonden, dat dinitro-o-cresol, opgelost in olie, een grooter toxische werking heeft dan wanneer het zonder olie gebruikt wordt.

Teneinde een beter inzicht te verkrijgen in de toxische werking van het dinitro-o-cresol, was het gewenscht na te gaan, op welke wijze deze werking door physische en chemische omstandigheden wordt beïnvloed en in welken toestand het dinitro-o-cresol het meest werkzaam is. Om dit vast te stellen, is bepaald de toxische werking van dinitro-o-cresol en van zijn zouten in waterige oplossing en tevens in alkalische en in zure minerale olie-emulsies. Hierbij is nagegaan, welke factoren de toxiciteit van het dinitro-o-cresol beïnvloeden.

Voor het onderzoek van de toxische werking van chemische bestrijdingsmiddelen is het van het grootste belang, dat men een goed uitgewerkte en nauwkeurig vastgelegde onderzoekingsmethode gebruikt. Voor het onderzoek naar de toxische werking van oviciden is daarom een laboratoriummethode uitgewerkt, welke ook voor het onderzoek van dinitro-o-cresol gebruikt is (2). Als proefobject worden hierbij eieren van de meelmot (*Ephestia Kühniella* Z.) gebruikt. Hoewel de ovicide stoffen in de praktijk hoofdzakelijk ter bestrijding van bladluizen (*Aphididae*) en van spintmijten (*Metatetranychus ulmi* KOCH) toegepast worden, is gebleken, dat het gebruik van meelmoteieren als proefmateriaal bij het onderzoek naar de toxische werking van wintersproeimiddelen, speciaal naar de werking op bladluiseieren, geen bezwaren oplevert. Er moet slechts in aanmerking genomen worden, dat voor het dooden van meelmoteieren een hoogere concentratie van het toxicans noodig is dan voor het dooden van bladluiseieren. Een principieel verschil tusschen de reactie van beide eisoorten op diverse toxicantia is tot nu toe niet waargenomen.

Het gebruik van meelmoteieren in plaats van bladluiseieren voor dit biologisch onderzoek van oviciden bezit vele voordeelen. In tegenstelling met bladluiseieren kunnen ze het geheele jaar door in groote hoeveelheden gekweekt worden en ze bezitten slechts een korte incubatieperiode; na ca 8 dagen komen de larven al uit de eieren, indien deze bewaard worden bij 20 °C. Hierdoor kunnen gedurende het geheele jaar proeven op meelmoteieren genomen worden, terwijl dit op bladluiseieren niet mogelijk is. Ook zijn de resultaten der proeven vlug bekend. In betrekkelijk korten tijd en onafhankelijk van het seizoen kunnen zoodoende betrouwbare aanwijzingen verkregen worden omtrent de ovicide werking van winter sproeimiddelen ter bestrijding van bladluizen op vruchtboomen.

De werkmethode, die bij dit onderzoek gevolgd is, is de zgn. afzuigmethode, welke het eerst gebruikt is door BREAKEY en MILLER (1). De eieren, ca 100 per proef, worden in een reageerbuis gebracht, die voor ¾ gevuld is met het te onderzoeken ovicide. De reageerbuis wordt daarna gesloten en gedurende ½ minuut ca 10 keer gekanteld. Daarna wordt de inhoud op een filtreerpapier in een Büchner-trechter gegoten, de vloeistof afgezogen en het gedeeltelijk droge filtreerpapier met de eieren er op in een petri-schaal gebracht. Op het filtreerpapier wordt de datum, het insecticide en de verdunning geschreven en de eieren worden geteld. De eieren worden daarna op het filtreerpapier in een open petri-schaal bewaard in een kast bij een temperatuur van 20 °C; aan het einde van den incubatietijd worden de eieren weer geteld om na te gaan, hoeveel er uitgekomen zijn.

Volgens deze onderzoekingsmethode zijn dus in het laboratorium proeven genomen op meelmoteieren om de ovicide werking van 3,5-dinitro-o-cresol te bepalen.

Ter contrôle zijn ook proeven genomen op bladluiseieren, nl. op eieren van *Rhopalosiphum crataegellum* THEOBALD. Deze proeven zijn echter niet volgens de

afzuigmethode uitgevoerd, maar takjes met eieren zijn in de vloeistof ondergedompeld.

Uit het onderzoek op meelmoteieren is gebleken, dat het dinitro-o-cresol veel sterker toxisch werkzaam is dan zijn zouten, hetgeen duidelijk te zien is in tabel I, waarin naast elkaar weergegeven zijn de resultaten, verkregen met oplossingen van ammonium-dinitro-o-cresolaat en van dinitro-o-cresol in water op meelmoteieren van 0–1 dag oud. Het opgegeven percentage dooding is de gemiddelde waarde van tien waarnemingen (na correctie met de blanco dooding). Van dit gemiddelde is de standaardafwijking bepaald:

$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\varepsilon\,(d)^2}{n(n-1)}}$ (d = deviatie, is individueele afwijking van het gemiddelde n = aantal waarnemingen).

TABEL I

Toxische werking van oplossingen van ammonium-dinitro-o-cresolaat en van dinitro-o-cresol op meelmoteieren van 0–1 dag oud

% concentr. dinitro-o-cresol	ammonium-dinitro-o-cresolaat		dinitro-o-cresol	
	% dooding	σ = stand. afw. v. gemidd.	% dooding	σ = stand. afw. v. gemidd.
0,24	99,9	± 0,11		
0,16	90,4	± 3,91		
0,128	81,3	± 5,28		
0,096	63,2	± 5,41		
0,06	52,0	± 4,60		
0,03	41,9	± 7,60		
0,024			99,6	± 0,16
0,016	35,0	± 7,52	97,5	± 0,66
0,012			86,1	± 2,05
0,009			62,3	± 3,96
0,006			17,3	± 2,32
0,003			0,4	± 0,27

Uit deze resultaten blijkt, dat het dinitro-o-cresol ca tien maal zoo toxisch is als het ammoniumzout.

Om na te gaan, waaraan deze hooge toxische werking van het zuur moet worden toegeschreven, moet eerst bekeken worden, welke verschillen er bestaan tusschen een waterige oplossing van het zuur en van de zouten.

Het eerste verschil is de pH; een oplossing van het zuur heeft een lagere pH dan van het zout, resp. ca 3,8 en ca 8; in een zure oplossing zijn dus meer H^+-ionen aanwezig. Het H^+-ion werkt als zoodanig echter niet giftig. Dit is gecontroleerd met een azijnzuuroplossing van een pH ca 3.

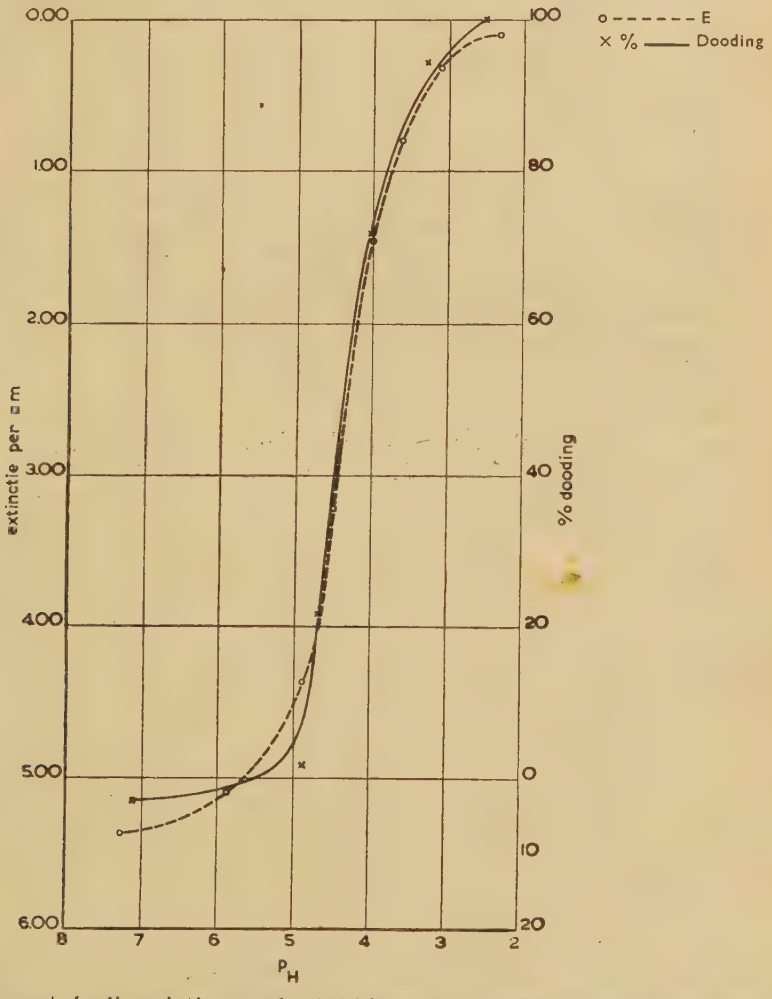
Verdere verschillen bestaan er tusschen beide oplossingen, doordat in een dinitro-o-cresol-oplossing meer ongesplitste dinitro-o-cresol moleculen en minder dinitro-o-cresolaat-ionen aanwezig zullen zijn dan in een zoutoplossing.

De eenige mogelijkheid om de hooge toxiciteit van het zuur te verklaren, is de toxische werking toe te schrijven aan de ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen; door een hooge toxiciteit van het dinitro-o-cresolaat-ion aan te nemen kan de hoogere werking van de zure oplossing niet verklaard worden.

Bij nadere bestudeering van deze zure dinitro-o-cresol-oplossingen bleek bovendien, dat de toxiciteit sterk afhankelijk is van de pH der oplossing en wel zoodanig, dat bij een lage pH de toxische werking veel hooger is dan bij een hoogere pH.

Doordat het ongedissocieerde zuurmolecuul, dat in oplossing is, geen of bijna geen kleur bezit, het dinitro-o-cresolaat-ion daarentegen geel tot oranjegeel gekleurd is, kon met behulp van een Pulfrich-photometer, door het bepalen van de lichtabsorptie (extinctie) van de oplossing bij een golflengte van 436 $\mu\mu$, nagegaan

FIGUUR I Extinctie van dinitro-o-cresol (voor golflengte 436$\mu\mu$) en dooding van meelmoteieren door dinitro-o-cresol (0.012 %) als functie van de p_H



worden hoe groot de dissociatie van de stof bij een bepaalde pH was, zoodat het gehalte aan ongedissocieerde moleculen bepaald kon worden.

Bij dit onderzoek is gebleken, dat er een sterk verband bestaat tusschen het verschil in de hoeveelheid ongedissocieerd zuur, welke in de oplossing aanwezig is, en het verschil in de toxische werking van oplossingen met verschillende pH. Van oplossingen van dinitro-o-cresol met een concentratie van 0,012% met verschillende pH is zoowel de extinctie als de doodende werking op meelmoteieren bepaald. De resultaten hiervan zijn in tabel II weergegeven.

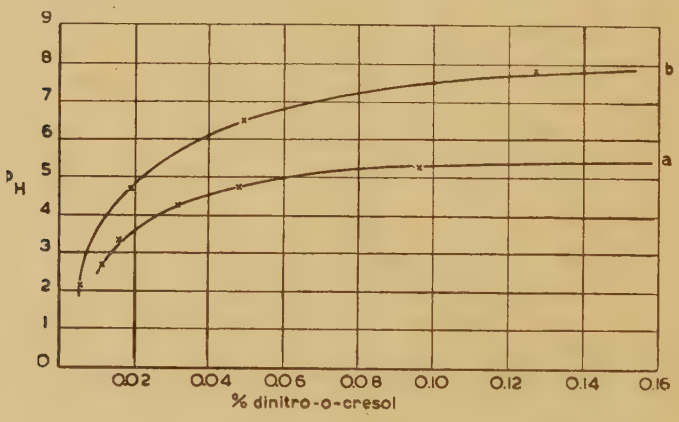
TABEL II

Dooding van meelmoteieren door, en extinctie (voor golflengte 436 μμ) van dinitro-o-cresol-oplossingen (conc. 0,012%) bij verschillende pH

pH (ext)	Extinctie per cm laagdikte	% Ongediss. dinitro-o- cresol	pH (dooding)	% Dooding	σ stand. afw. v. gemidd.
2,3	0,072	98,4	2,5	100	0
3,2	0,302	95,0	3,3	93,9	± 1,66
3,6	0,750	86,7	3,7	80,3	± 4,05
4,0	1,484	72,5	4,0	71,3	± 5,01
4,5	3,230	40,0	4,7	21,6	± 2,28
4,9	4,370	15,0	4,9	2,0	± 1,05
5,9	5,100	0,0	5,9	– 1,1	± 2,90
7,3	5,360	0,0	7,15	– 2,9	± 2,23

Het opgegeven percentage dooding is hier weer de gemiddelde waarde van tien waarnemingen. Uit deze resultaten komt zeer sterk naar voren, dat de toxische werking van deze oplossingen geheel aan de aanwezigheid van ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen moet worden toegeschreven (figuur 1). Om het effect van een zure dinitro-o-cresol-oplossing, dus van ongedissocieerd zuur, te behouden, moet de pH der oplossing dus vrij laag blijven, aangezien de dissociatie bij een pH ca 4,5 reeds voor 50% is ingetreden.

FIGUUR 2 100 % Dooding van dinitro-o-cresol op meelmoteieren (a) en op eieren van Rhopalosiphum crataegellum (b) als een functie van de P_H en de dinitro-o-cresol concentratie



Ook de concentratie van dinitro-o-cresol in de oplossing is echter van belang voor de doodende werking op eieren. Daarom is nagegaan wat de hoogste pH is om bij een gegeven concentratie nog 100% dooding der eieren op te leveren. Onderzocht zijn oplossingen van verschillende concentratie, terwijl van iedere concentratie drie oplossingen, elk met een andere pH, gebruikt zijn. De pH's zijn bijgesteld met een calciumbicarbonaatoplossing, de hoogere pH's, welke met deze oplossing niet bereikt konden worden, met een KOH-oplossing. De pH-bepalingen zijn uitgevoerd met de glaselectrode. Deze proef is in vijfvoud genomen met meelmoteieren van 0–1 dag oud. Uit de resultaten (tabel III) blijkt duidelijk, dat, indien de pH der oplossing hooger wordt, de concentratie, welke noodig is om 100%

der eieren te dooden, ook hooger wordt. In figuur 2 is deze concentratie, welke noodig is om bij een gegeven pH 100% der meelmoteieren te dooden, grafisch voorgesteld (lijn *a*).

TABEL III

Toxische werking
op meelmoteieren van dinitro-o-cresol-oplossingen van verschillende concentratie en pH

% concentratie dinitro-o-cresol	pH	% Dooding
0,012	2,75	98,0
0,012	3,00	97,2
0,012	3,25	91,8
0,016	3,25	99,6
0,016	3,50	94,6
0,016	3,75	90,2
0,032	4,25	95,8
0,032	4,50	96,6
0,032	4,75	84,8
0,048	4,75	98,0
0,048	5,00	59,0
0,048	5,25	51,2
0,096	5,25	98,8
0,096	5,50	92,4
0,096	5,75	29,2
0,24	6,50	43,4 [1])
0,24	6,75	51,4 [1])
0,24	7,0	53,8 [1])

Een soortgelijk onderzoek is ook uitgevoerd op eieren van de bladluis *Rhopalosiphum crataegellum*. Eieren op takjes zijn gedurende ½ minuut in de vloeistof ondergedompeld, waarna ze, na opdrogen, bewaard zijn in cartonnen pillendoozen, waarvan het deksel door kaasdoek vervangen was. Deze doozen werden gezet in een open zomerhuisje, totdat de eieren uitgekomen waren en contrôle kon plaats vinden. De proef is in tienvoud gedaan, nl. vijf maal met eieren, afkomstig uit den Beemster, en vijf maal met eieren, afkomstig uit Hillegom. Het opgegeven percentage dooding (tabel IV) is de gemiddelde waarde van deze vijf waarnemingen (niet gecorrigeerd met de blanco dooding).

TABEL IV

Toxische werking op eieren van Rhopalosiphum crataegellum Theobald
van dinitro-o-cresol-oplossingen van verschillende concentratie en pH

% concentratie dinitro-o-cresol	pH	% dooding	
		Beemster	Hillegom
0,008	ca 2,0	100	96,2
	3,9	100	75,0
	ca 5	99,6	88,4
	ca 7	94,0	72,8
0,032	4,7	100	100
	6,3	99,8	98,4
blanco		68,1	31,8

De resultaten van de proeven op eieren van *Rh. crataegellum* wijzen wel in dezelfde richting als die van de proeven op meelmoteieren, wat betreft den invloed

[1]) Het verschil dat bij deze waarnemingen optreedt valt binnen de foutengrens.

van de pH op de toxische werking van dinitro-o-cresol-oplossingen, hoewel de voorbeelden niet zoo sprekend zijn.

Over het algemeen leenen eieren van bladluizen zich niet zoo goed voor vergelijkende laboratoriumproeven, omdat zij zeer gevoelig zijn voor allerlei invloeden, zooals luchtvochtigheid, hetgeen reeds tot uiting komt in de hooge dooding der onbehandelde eieren (blanco). Resultaten uit het onderzoek op meelmoteieren geven een helderder inzicht in het probleem.

Opmerkelijk is ook het verschil tusschen de resultaten, verkregen met eieren van verschillende herkomst. Eieren, afkomstig uit den Beemster, zijn zwakker tegenover dinitro-o-cresol-oplossingen dan eieren, afkomstig uit Hillegom. Dergelijke verschillen maken het onderzoek niet eenvoudiger.

Uit deze en andere proeven met *Rhopalosiphum* kon echter een soortgelijke curve gemaakt worden (figuur 2, lijn *b*) als voor meelmoteieren, waarin grafisch weergegeven is de concentratie van dinitro-o-cresol-oplossingen, welke bij een gegeven pH noodig is om 100% der eieren te dooden. Voor deze grafische voorstelling zijn gegevens gebruikt, verkregen op eieren, afkomstig uit de Beemster (tabel V).

TABEL V

Concentratie van dinitro-o-cresol-oplossingen, waarbij 100% *dooding van eieren van Rhopalosiphum crataegellum (afkomstig uit de Beemster) verkregen is bij verschillende pH der oplossingen*

pH	concentratie dinitro-o-cresol
2,2	0,006
4,1	0,005
4,7	0,018
6,5	0,048
ca 7,8	0,128

Voor bladluiseieren is een lagere concentratie noodig dan voor meelmoteieren, zoodat om bij beide eisoorten eenzelfde effect te bereiken de pH der oplossingen voor bladluiseieren hooger mag zijn dan voor meelmoteieren. Het principe echter, dat de toxiciteit toegeschreven moet worden aan de ongedissocieerde zuurmoleculen, blijft voor beide eisoorten van kracht.

Naast het onderzoek van zure dinitro-o-cresol-oplossingen zijn ook, behalve oplossingen van ammonium-dinitro-o-cresolaat, enkele andere alkalizouten van dinitro-o-cresol onderzocht, om na te gaan, of er verschil bestaat tusschen de toxische werking van oplossingen van ammonium-, kalium-, natrium- en lithiumzout bij gelijke omstandigheden van concentratie en pH. Hiervoor zijn gebruikt oplossingen in gedestilleerd water van de gezuiverde zouten, in een concentratie van ca 0,26%, terwijl de pH der oplossingen, onder eventueele toevoeging van de overeenkomstige hydroxyde, gebracht werd op ca 7 en ca 9. De toxiciteitsbepalingen zijn in vijfvoud uitgevoerd op meelmoteieren. Uit de resultaten, welke met dit onderzoek verkregen werden (tabel VI), blijkt duidelijk, dat het ammoniumzout de grootste toxische werking bezit, terwijl tusschen de toxiciteit der drie andere zouten geen of practisch geen verschil geconstateerd kan worden. Verder valt uit deze proef eveneens af te leiden, dat de ongedissocieerde zoutmoleculen geen toxisch effect bezitten, omdat bij verhooging der pH van 7 tot 9, dus bij een verhooging van de concentratie der ongedissocieerde zoutmoleculen de doodende werking niet toeneemt, maar juist lager wordt.

TABEL VI

Ovicide werking op meelmoteieren van waterige oplossingen van het ammonium-, kalium-, natrium- en lithium-dinitro-o-cresolaat bij een concentratie van 0,26% en een pH van resp. ca 7 en ca 9; eieren van 0–1 dag oud

preparaat	% conc.	pH	% dooding	$\sigma =$ stand. afw. v. gemidd.	pH	% dooding	$\sigma =$ stand. afw. v. gemidd.
Ammonium-dinitro-o-cresolaat	0,261	7,1	100	$\pm$ 0,00	8,9	100	$\pm$0,00
Kalium-dinitro-o-cresolaat	0,286	7,0	79,6	$\pm$ 3,80	8,9	40,6	$\pm$2,18
Natrium-dinitro-o-cresolaat	0,267	7,2	78,3	$\pm$ 1,87	9,0	55,0	$\pm$5,23
Lithium-dinitro-o-cresolaat	0,247	7,1	76,3	$\pm$ 6,14	9,1	45,7	$\pm$1,96

De hoogere toxiciteit van het ammoniumzout boven die van de andere drie zouten moet waarschijnlijk toegeschreven worden aan de mogelijkheid, dat onder invloed van het CO_2 van de lucht en door de vluchtigheid van NH_3 (en een eventueele adsorptie van NH_3 aan de cellen) in de vloeistof, welke op het ei achterblijft bij de ammoniumzout-oplossing een lagere pH gevormd zal worden dan bij de oplossingen van de andere zouten. Er zullen daar dus meer ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen aanwezig zijn, hetgeen de hoogere toxiciteit kan verklaren.

Bij de proeven van GIMINGHAM en TATTERSFIELD (4), waarop zij hun meening baseerden, dat de toxische werking van dinitro-o-cresol en van zijn zouten onderling slechts weinig zou verschillen en dat het ammonium- en het natrium-dinitro-o-cresolaat een iets hoogere toxische werking zouden bezitten dan het kalium- of bariumzout, hebben zij geen aandacht geschonken aan de pH van de diverse oplossingen. De optredende verschillen bij hun proeven tusschen de toxiciteit van de zouten zullen grootendeels aan verschil in pH moeten worden toegeschreven, terwijl het geringe verschil tusschen de werking van het zuur en de zouten verklaard moet worden door aan te nemen, dat er een te gering verschil in de pH der beide oplossingen zal hebben bestaan.

Ook de andere onderzoekers, die gewerkt hebben met dinitro-o-cresol-oplossingen als toxicans, hebben steeds de pH der oplossingen buiten beschouwing gelaten. Omdat juist de pH der oplossingen voor de toxische werking van deze stof van zoo groot belang is, verliezen deze literatuurgegevens veel van hun waarde.

Op grond van bovengenoemde onderzoekingen aangaande de toxische werking van de ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen, was het product Shell Nitroleum samengesteld. Ondanks de op deze gegevens gebaseerde samenstelling echter, zijn dit jaar in een aantal gevallen de bladluizen door een bespuiting met deze Nitroleum niet voldoende bestreden. Bij nader onderzoek is gebleken, dat dit zeer waarschijnlijk hoofdzakelijk of alleen toegeschreven moet worden aan het feit, dat het gebruikte verdunningswater slechts een temperatuur van ca 0 °C had. De oplosbaarheid van het dinitro-o-cresol bij deze lage temperatuur is zeer gering; bij een zeer lage pH zelfs beneden de concentratie, die noodig is om bladluiseieren te dooden. Verhooging van de hoeveelheid dinitro-o-cresol in de vloeistof heeft in dat geval totaal geen effect op de toxische werking, zoodat ook fruittelers, die dachten ,dat in vergelijking met andere dinitro-o-cresol-producten de concentratie, welke voor de verspuiting van Shell Nitroleum aangeraden werd, veel te laag was en daarom een hoogere concentratie in de sproeivloeistof brachten, hiermee geen gunstig effect hebben bereikt. In gevallen, waar water van wat hoogere temperatuur gebruikt is, zijn zeer veel goede resultaten verkregen. De

TABEL VII

Ovicide werking op meelmoteieren en op bladluiseieren van een alkalische minerale olie-emulsie zonder en met 2% dinitro-o-cresol in de olie en van een zure minerale olie-emulsie zonder en met ½% dinitro-o-cresol in de olie

preparaat	% conc. van preparaat in sproei-vloeistof	% dooding			
		meelmoteieren		eieren van *Doralis pomi*	
		zonder dinitro-o-cresol	met dinitro-o-cresol	zonder dinitro-o-cresol	met dinitro-o-cresol
Alkalische min. olie-emulsie zonder of met 2% dinitro-o-cresol	15	90,6	99,9		
	10	86,2	97,6		
	8	84,6	92,7	80,4	
	6	80,7	90,1		
	4	75,8	82,6	81,3	100
	2	65,6	67,8	80,0	99,1
	1	58,0	47,3	69,0	99,6
	0,5	29,3	35,3		97,0
Zure min. olie-emulsie zonder of met ½% dinitro-o-cresol	4	91,9	99,8		
	2	83,5	98,3		99,0
	1	71,1	89,1		95,5
	0,5	58,0	71,4		84,5

samenstelling van het product Nitroleum wordt nu echter zoodanig gewijzigd, dat, ook indien voor verdunning van de geconcentreerde pasta water van lage temperatuur moet worden gebruikt, een doeltreffende bestrijding der bladluizen verkregen kan worden.

Naast deze proeven met dinitro-o-cresol in waterige oplossingen is ook de werkzaamheid van deze stof onderzocht, wanneer zij in combinatie met olie gebruikt werd. Hiervoor zijn zoowel alkalische als zure minerale olie-emulsies, waarin dinitro-o-cresol aanwezig was, in het onderzoek betrokken. Voor de bereiding van deze emulsies werd een dun vloeibare, vrij sterk geraffineerde smeerolie, een spindelolie gebruikt.

In een minerale olie-emulsie, waarin dinitro-o-cresol aanwezig is, stelt zich een evenwicht in tusschen de concentratie dinitro-o-cresol in de waterphase en die welke in de oliephase oplost. De verdeelingscoëfficiënt van het dinitro-o-cresol in de water- of oliephase opgelost, is sterk afhankelijk van den zuurgraad der emulsie. Bij hooge pH is practisch al het dinitro-o-cresol aanwezig in de waterphase als dinitro-o-cresolaat, gesplitst in ionen, terwijl bij lage pH practisch alle dinitro-o-cresol als ongesplitst zuur molecuul in de olie oplost. De overgang van dinitro-o-cresol van de olie- naar de waterphase vindt nl. plaats tusschen pH ca 4,5 en pH ca 8,5, waarbij tusschen pH 6 en 7 de grootste evenwichtsverandering plaats vindt. In een alkalische emulsie is dus het dinitro-o-cresol hoofdzakelijk in de waterphase als dinitro-o-cresolaat-ion aanwezig; in een zure emulsie lost alles of een groot deel van de stof in de olie op als ongedissocieerd zuur, terwijl datgene, wat in de waterphase zit, slechts gedeeltelijk in ionen is gesplitst (fig. 1). De verhouding tusschen de concentratie in water- of oliephase is dus steeds afhankelijk van de pH, eveneens de hoeveelheid ongesplitste zuurmoleculen.

De toxiciteit van het dinitro-o-cresol, gecombineerd met olie, zal dus in een zure emulsie grooter zijn dan in een alkalische, omdat in een zure emulsie meer ongedissocieerde zuurmoleculen voorkomen.

Dit blijkt dan ook in het biologisch onderzoek, zoowel bij proeven op meel-

moteieren als op bladluiseieren (tabel VII), voor welke laatste eieren van *Doralis pomi* DE GEER gebruikt zijn. De alkalische emulsie met dinitro-o-cresol bevatte 2% van deze stof, berekend op de oliephase (70% der emulsie); de zure emulsie ½%, eveneens berekend op de oliephase (75% der emulsie). Ter vergelijking zijn tegelijkertijd ook onderzocht alkalische en zure emulsies zonder dinitro-o-cresol. De pH der alkalische emulsies was onverdund ca 9, van de zure emulsies ca 5; de alkalische emulsie werd verdund met gedestilleerd water, de zure emulsie met gedestilleerd water, dat met azijnzuur aangezuurd was tot pH 5. De proeven zijn in tienvoud uitgevoerd.

Uit de resultaten blijkt in beide gevallen een toename van de toxiciteit der emulsie door toevoeging van dinitro-o-cresol. Deze toename is in een zure emulsie ongeveer even groot als in een alkalische, hoewel de totale concentratie van het dinitro-o-cresol in de alkalische emulsie vier maal zoo groot is als in de zure. Er is dus ook hier weer een duidelijk grootere toxische werking van het dinitro-o-cresol in zuur milieu.

De opgave van SHAW en STEER (7), dat voor *Aphis pomi* een concentratie van 0,05% dinitro-o-cresol, indien opgelost in olie, reeds voldoende is om 100% der eieren te dooden, is dus niet volledig; er wordt nl. geen rekening gehouden met de pH der oplossingen. Indien in een alkalische olie-emulsie aanwezig, dan zal een concentratie van 0,05% dinitro-o-cresol (ca 3% emulsie) een dooding van 99 tot 100% der eieren geven; in een zure olie-emulsie echter zal een veel geringere concentratie reeds een zelfde effect bezitten. Hoe groot deze concentratie moet zijn, is in hoofdzaak afhankelijk van de pH der sproeivloeistof.

CONCLUSIES

De toxiciteit van dinitro-o-cresol-oplossingen moet toegeschreven worden aan de giftige werking van ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen. Aangezien een zure oplossing van deze stof veel meer ongedissocieerde zuurmoleculen bevat dan een alkalische, is de giftige werking van dit toxicans sterk afhankelijk van de pH der oplossing. Er is een sterke evenredigheid geconstateerd tusschen de hoeveelheid aanwezige dinitro-o-cresol-moleculen in oplossingen van verschillende pH en de toxische werking ervan op meelmoteieren en op bladluiseieren. De hooge toxische werking van deze moleculen komt zoowel in waterige oplossing als gecombineerd met minerale olie naar voren, zoodat in beide gevallen de pH de belangrijkste factor vormt voor het toxische effect van de vloeistof.

Aan de dinitro-o-cresolaat-ionen moet waarschijnlijk geen toxische werking worden toegeschreven, evenmin aan ongedissocieerde dinitro-o-cresolaat-moleculen. Van de vier onderzochte alkalizouten van dinitro-o-cresol is het ammoniumzout toxischer dan het kalium-, natrium- en lithiumzout, welke drie laatste een even groote werking uitoefenen. De hoogere toxiciteit van het ammoniumzout moet waarschijnlijk ook teruggebracht worden tot de werking van ongedissocieerde dinitro-o-cresol-moleculen.

Voor de nieuwe gezichtspunten, welke dit onderzoek voor de bereiding van sproeimiddelen heeft opgeleverd, werden octrooien aangevraagd.

LITERATUUR

1. Breakey, E. P. and Miller, A. C., A method for comparing the ovicidal properties of contact insecticides. J. Econ. Entomol. 28 (1935), 353–358.
2. Dierick, G. F. E. M., De ovicide werking van wintersproeimiddelen, bestudeerd in het laboratorium. Diss. Amsterdam 1942. Van Gorcum en Comp., Assen.
3. Gimingham, C. T., Massee, A. M. and Tattersfield, F., A quantitative examination of the toxicity of 3 : 5 dinitro-o-cresol and other compounds to insect eggs, under laboratory and field conditions. Ann. Applied Biol. 13 (1926), 446–463.
4. Gimingham, C. T. and Tattersfield, F., Laboratory and field experiments on the use of 3 : 5 dinitro-o-cresol and the sodium salt for winter spraying. J. Agr. Sci. 17 (1927), 162–180.
5. Gimingham, C. T. en Tattersfield, F., A report on field trials with 3 : 5 dinitro-o-cresol and its sodium salt for winter spraying. J. Pomology Hort. Sci. 7 (1928–1929), 146–155.
6. Hough, W. S., Dinitro-o-cresol, dinitro-o-cyclohexylphenol and lauryl-rhodanate in dormant sprays against eggs of Apple Aphis. J. Econ. Entomol. 32 (1939), 264–270.
7. Shaw, H. and Steer, W., Studies on the toxicity of certain nitrophenols, thiocyanates, naphthaline derivatives and organic bases to the eggs of some common orchard pests. J. Pomology Hort. Sci. 16 (1939), 364–388.

UIT DE BUITENLANDSCHE LITERATUUR

BESTRIJDING VAN DE KOOLWANTS

FREY, W., *Versuche zur Bekämpfung der Kohlwanze* (*Eurydema oleraceum L.*) *mit chemischen Mitteln*, Arb. phys. angew. Ent., Bd 9, Nr 2, pp. 77–89, Augustus 1942.

In de jaren 1940 en 1941 is de koolwants in verschillende gedeelten van Duitschland zeer schadelijk opgetreden aan koolrapen. (Ook in Nederland kwam in 1940 dit insect vrij veelvuldig voor, vgl. Jaarverslag P.D., 1940.) In de literatuur worden wel korte aanwijzingen over de bestrijding gegeven, doch deze berusten meerendeels op slechts kleine veldwaarnemingen. Nauwkeurige proeven, in het bijzonder laboratoriumproeven, met opgave van doseering, percentage gedoode dieren enz., ontbreken tot nu toe.

De schrijver heeft in 1941 een vrij groot aantal spuit- en stuifmiddelen in het laboratorium op hun werkzaamheid onderzocht met het doel, de beste in 1942 bij veldproeven verder te probeeren. Voor zoover handelspreparaten gebruikt zijn, zijn zij alle in het Merkblatt der Biologische Reichsanstalt opgenomen.

2% Lysol-oplossing, zooals veel in de literatuur aanbevolen, bleek tegen imagines lang niet afdoende te werken; ook 4%, hoewel duidelijk beter, bleef beneden het peil, dat men in het laboratorium dient te bereiken. Larven van verschillende ontwikkelingsstadia werden echter in 4 uren voor 100% gedood. Proeven om de beschadiging aan koolrapen vast te stellen, konden helaas eerst in begin September genomen worden op vrijwel volwassen planten. De resultaten waren verschillend; vermoedelijk zijn de weersomstandigheden er op van invloed. Voorzichtigheid blijft, vooral bij jonge planten, in elk geval geboden.

Een oplossing van 2% petroleum en 5% zachte zeep (restanten van voor-oorlogsche kwaliteit werden gebruikt) werkte tegen imagines evenmin voldoende. Goed resultaat werd verkregen met 5% petroleum en 5% zeep.

Vervanging van de zeep door een uitvloeier leverde minder goed resultaat op en vervanging door pastavormige ,,zeepsurrogaat'' faalde geheel.

Op de larven waren alle gebruikte petroleum-zeepoplossingen afdoend werkzaam. Bladverbranding trad hierbij slechts in geringe mate op.

Wanneer in plaats van petroleum ruwe olie met zeep in oplossing werd geprobeerd, werden ongeveer dezelfde resultaten verkregen als met petroleum-zeepoplossing. Ruwe olie met den uitvloeier was echter even werkzaam en ruwe olie met ,,zeepsurrogaat'' daarentegen weer onbevredigend.

Bladverbranding door de ruwe olie-emulsies was niet van beteekenis.

Derrisstuifmiddelen bleken, zelfs bij hooge concentratie (tot 3% rotenon) en bij doseering naar rato van 50 kg per ha, zeer onvoldoende werkzaam te zijn. Na een dag was in het gunstigste geval nog slechts 29% der proefdieren gedood. Derris spuitmiddelen leverden nog ongunstiger resultaat. De Pyrethrumstuif- en -spuitmiddelen bleken voor dit doel volkomen waardeloos te zijn, terwijl de handelspreparaten van gemengde samenstelling niet beter waren dan de middelen, die alleen Derris of alleen Pyrethrum bevatten. Slechts één preparaat maakte een gunstige uitzondering, doch daarvan was slechts een klein, oud monster beschik-

baar, terwijl het middel niet meer leverbaar is. Verdere proeven konden er dan ook niet mee genomen worden.

Beter dan alle vorengenoemde middelen werkte het dinitro-o-creso!-stuifmiddel „A". Reeds in een geringe dosis, naar rato van 10 kg per ha, werden de proefdieren binnen 4 uren voor 100% gedood. Helaas is de bladverbrandende werking van dit middel te sterk. Hoewel de harten der planten in leven bleven en weer nieuwe bladeren vormden, werden alle op het moment der bestuiving aanwezige bladeren volledig tot afsterven gebracht.

Vermenging met een vijfvoudige hoeveelheid talk leverde bij een dosis van 20 kg per ha nog zeer voldoende resultaat, doch veroorzaakte ook nog een zoodanige bladverbranding, dat men niet onvoorwaardelijk de toepassing in de praktijk kan aanraden. Vermenging met een achtvoudige hoeveelheid talk leverde tegen de insecten geen voldoend resultaat meer op.

Twee contact-stuifmiddelen voor den boschbouw, van geheime samenstelling, leken aanvankelijk goed te voldoen. Na 8 dagen herstelde zich echter een vrij belangrijk deel der verlamde insecten weer geheel, zoodat in de praktijk geen bevredigend resultaat mag worden verwacht.

Nicotine-spuitmiddelen faalden tegen de imagines. Met een nicotine-stuifmiddel kon slechts één proef genomen worden, welke wel resultaat opleverde, doch meer proeven zijn noodig voor de vorming van een oordeel.

Een proef met een Quassia-spuitmiddel in een sterkte vijfmaal zoo hoog als voor pruimezaagwesp noodig is, leverde een volkomen onvoldoend resultaat op.

Voor de praktijk mag van de petroleum-zeep-emulsies en de ruwe-olie-zeep-emulsies het meest verwacht worden. Zeep is thans echter bijna niet beschikbaar. Vervanging door den beproefden uitvloeier (Netz- und Haftmittel „L") is mogelijk, vooral bij gebruik van ruwe olie.

Levert het verkrijgen van deze grondstoffen te veel moeilijkheden op, dan komen de Lysoloplossingen het meest in aanmerking, maar men moet op grootere bladverbranding rekenen.

Van de stuifmiddelen is alleen het dinitro-o-cresol-stuifmiddel „A" afdoend werkzaam doch slechts onder bijzondere omstandigheden toe te passen. Is b.v. slechts een smalle rand van het veld ernstig aangetast, zooals men vaak kan waarnemen, dan kan het overweging verdienen, voor een snelle en afdoende vernietiging van het insect een sterke beschadiging der randplanten op den koop toe te nemen. Bij voorzichtige bestuiving bij windstil weer, om de rest van het veld niet te beschadigen, zou in zoodanig geval wel zeer goed resultaat mogelijk zijn.

Uitgebreide veldproeven kunnen de vorming van een definitief oordeel mogelijk maken.

B. J. Hermans

AANTASTING VAN GRANEN DOOR HET „GRASLANDAALTJE"

H. Goffart, *Der Wiesennematode, Pratylenchus pratensis (de Man 1880), ein wenig bekannter Getreideschädling.* Ztschr. f. Pflz. krankh. u. Pflz. Schutz. Bd 52, H. 5, Mei 1942.

Op de Dienststelle für Nematodenforschung an der Zweigstelle Kiel der Biol. Reichsanstalt worden sedert eenige jaren graanplanten ter onderzoek ontvangen, die in meer of mindere mate armelijken groei vertoonen en aanleiding geven tot verschillende vermoedens omtrent de ziekteoorzaak. Dikwijls ligt het voor de hand te denken aan ongunstigen bodemtoestand of physiologische groeistoringen

doch nauwkeurig onderzoek leidt bijna steeds tot een sterke aantasting door aaltjes en wel in hoofdzaak door Pratylenchus pratensis.

Dit aaltje, dat ver over de 100 wilde- en cultuurplanten kan aantasten, heeft volgens de literatuur een zeer sterke verspreiding, die niet tot Europa beperkt is. Ook in Noord-, Middel- en Zuid-Amerika en de naburige eilanden komt het voor.

Een aantasting in een winterroggeakker, die in het begin van April 1941 werd waargenomen, wordt als volgt beschreven. Pleksgewijze bleven de planten teer en klein en vertoonden geen neiging om in de aar te schieten. Bij bezichtiging in Juni onderscheidden deze plekken zich op eenigen afstand gezien als donkere eilanden, die zouden doen denken aan schade door te veel water. De oppervlakte dezer plekken was meestal 20 tot 30 m². Samen vormden zij echter een belangrijke oppervlakte, die 5 tot 20% van den aangetasten akker kon bedragen. De rogge was niet alleen in groei blijven stilstaan, maar „hij kroop weer in den grond terug". Tallooze, nauwelijks 15 cm hooge planten vertoonden verwelkte en opgerolde, lange en smalle bladeren; andere planten waren reeds geheel afgestorven. Hun laatste, necrotisch verkleurde resten bedekten nog den grond. Weer andere, die klaarblijkelijk meer weerstand hadden kunnen bieden, vertoonden ernstige zwakte. Uitstoeling ontbrak geheel. De op een dunnen voet staande, draadvormige halm droeg een uiterst schamele aar, die niet in staat was om ook maar een bescheiden oogst op te leveren. De wortels vertoonden in gunstige gevallen donkere vlekken; dikwijls waren zij geheel donkerbruin verkleurd en haarfijn.

Haver vertoonde in het algemeen dezelfde ziekteverschijnselen doch in de meeste gevallen was de aantasting minder hevig dan in rogge. Ook bij andere zomergranen kunnen deze aaltjes onder bepaalde omstandigheden schade doen. Men treft zelfs nauwelijks graanwortels aan, die geheel vrij van aaltjes zijn.

In de literatuur worden nog tal van gewassen genoemd, die onder deze aantasting meer of minder sterk kunnen lijden.

De aanwezigheid der aaltjes is het gemakkelijkst vast te stellen door de grondig schoongespoelde wortels in een schaal met water te leggen, zoo noodig na voorafgaande kneuzing. Na korten tijd vindt men een groot aantal aaltjes in het water, doch er blijven altijd nog enkele exemplaren in de wortels achter. Door kleuring met jood-joodkali en daaropvolgend opbleeken laten de aaltjes in het weefsel zich gemakkelijk aantoonen.

Bij het nagaan der omstandigheden, die bij een schadelijk worden dezer aaltjes zijn waar te nemen, komt men tot het resultaat, dat de ziekte in Noord-Duitschland bijna uitsluitend van beteekenis is op lichten, humusarmen grond, dikwijls met een ondergrond rijk aan kiezel. waarop wegens zijn bodemtoestand zeer vaak dikwijls om het andere jaar, een graangewas verbouwd wordt. In droge perioden blijken de aaltjes bijzonder graag de saprijke wortels op te zoeken in verband met hun behoefte aan vocht. In jaren met regenrijk voorjaar zijn gevallen van dergelijke schade nog niet waargenomen.

Op grond hiervan moet ter bestrijding aangeraden worden, den graanverbouw op besmette velden zooveel mogelijk te beperken en te vervangen door verbouw van hakvruchten of andere gewassen. Zeker moet men niet graan na een graangewas verbouwen, omdat hierdoor de vermeerdering sterk wordt bevorderd. Ook van maatregelen ter verbetering van de waterhuishouding in den grond mag vermindering van de schade worden verwacht. Chemische middelen komen vooralsnog minder in aanmerking, omdat hun werking op lichte gronden tot nu toe zeer onzeker is geweest.

B. J. HERMANS

DERRIS TEGEN BIETENAASKEVERS

Die Bekämpfung des Rübenaaskäfers (Blitophaga opaca L.) mit Derris. O. KAUFMANN, Anz. f. Schädl.k., XVIII, 5.

f A 32: 70

Ondanks de voorafgegane strenge winters veroorzaakten de larven der bietenaaskevers in 1940 en 1941 vooral in Noord-Duitschland groote schade. In 1941 was de aantasting zoo ernstig en gelijktijdig zoo algemeen verspreid, dat men van een epidemie moet spreken. Grootendeels werd de soort *Blitophaga opaca* aangetroffen, terwijl *B. undata* slechts plaatselijk en dan nog altijd samen met eerstgenoemde optrad. Dikwijls werd de schade pas gemeld, wanneer de larven na het doorhakken der bieten het grootste deel van het loof reeds opgevreten hadden, zoodat nog slechts de kale nerven en de kleinste hartblaadjes waren overgebleven.

Omdat op vele plaatsen spoedig een tekort ontstond aan het bekende bestrijdingsmiddel, nl. zemelen met een fluoor- of arsenicumpreparaat, terwijl daarentegen een belangrijke hoeveelheid van het laagprocentige Derrispreparaat Kümex beschikbaar was, lag het voor de hand dit te probeeren. Dit Kümex, dat tegen koolzaadglanskever en aardvlooien reeds bij andere gelegenheid zeer werkzaam was gebleken, en een rotenongehalte van slechts 0,8% heeft, stond ter beschikking in drie vormen, nl.: 1. onvermengd, 2. vermengd met de halve hoeveelheid talk en 3. met een gelijke hoeveelheid talk.

Alle veldproeven leverden bevredigend tot zeer goed resultaat op. Bij de eerste proef, waarbij gestoven werd met aan een stok gebonden gazen zakjes en waarbij 40 kg Kümex per hectare werd verbruikt, werd niet minder dan 91% der larven gedood, niettegenstaande het feit, dat de bestuiving verricht werd door Poolsche krijgsgevangenen, die het middel zeer ongelijkmatig over het veld verdeelden, terwijl bovendien 's avonds na de behandeling regen viel.

Bij de overige veldproeven, waarbij kleinere hoeveelheden van Kümex en de Kümex-mengsels gebruikt werden, wisselde het resultaat van 60 tot 79%. De resultaten werden bepaald door nauwkeurige tellingen vóór en enkele dagen na de behandeling, waarbij rekening werd gehouden met de natuurlijke vermindering van het aantal larven (door verpopping).

Gelijktijdig genomen laboratoriumproeven gaven eveneens goede resultaten. Hoe jonger de larven, hoe gevoeliger zij bleken te zijn. Larven in het eerste en tweede stadium werden voor 100% binnen vier dagen gedood, van de larven in het derde stadium bleven er enkele in leven en brachten het na verpopping nog tot imago.

Bij deze proeven bleek de doodende werking veel sneller te zijn dan die van een maagvergift, zoodat men niet op een periode van droog weer aangewezen is en in den regel slechts eenmaal de behandeling behoeft uit te voeren. In het gunstigste geval werd met 12½ kg van het 2 deelen Kümex op 1 deel talk bevattende mengsel binnen vier dagen nog meer dan 75% der larven gedood. Hoeveelheden van 20 tot 25 kg per hectare zullen vermoedelijk voor alle gevallen wel voldoende zijn.

B. J. HERMANS

RECTIFICATIE Nov.-Dec. aflevering 6, 1942

Blz. 229, regel 16 van boven: (18), moet zijn: (22).

Blz. 233, regel 4 van boven: Wageningen, No. 11, 1935, moet zijn: 22. Plantenziekten, waarmede rekening moet worden gehouden bij de keuring te velde van landbouwgewassen. Verslagen en Mededeelingen van den Plantenziektenkundigen Dienst No. 11, 4e druk 1938, blz. 9–10.

Blz. 234, Fig. 6: A B C D, moet zijn resp. D. C. B. A.